

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Caracterização de *Enterococcus* spp. e *Aeromonas* spp.
isolados de produtos hortícolas de agricultura biológica e
convencional**

Inês Catarina Imaginário Marques

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Professora Doutora Mónica Sofia Vieira Cunha

2016



**Caracterização de *Enterococcus* spp. e *Aeromonas* spp.
isolados de produtos hortícolas de agricultura biológica e
convencional**

Inês Catarina Imaginário Marques

2016

Esta dissertação foi realizada no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (CIISA-FMV) sob a orientação direta da Professora Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. A Professora Doutora Mónica Sofia Vieira Cunha foi a orientadora interna designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

“A paciência e a perseverança têm o efeito mágico de fazer nas dificuldades desaparecerem.”

John Quincy Adams

Agradecimentos

Deixo os meus sinceros e profundos agradecimentos às pessoas que foram essenciais e que contribuíram para a concretização desta etapa da minha vida.

À minha orientadora Professora Doutora Manuela Oliveira, por tudo. Pela constante disponibilidade, preocupação e partilha de conhecimentos ao longo do trabalho. Foi sem dúvida incansável.

À minha coorientadora Professora Doutora Teresa Semedo-Lemsaddek a quem agradeço o seu acompanhamento que enriqueceu este trabalho, tendo sido igualmente incansável.

Obrigada às duas, do fundo do meu coração!

À minha orientadora interna Professora Doutora Mónica Cunha pela sua disponibilidade e por ter contribuído para a revisão deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, especialmente aos departamentos de Microbiologia e Imunologia, Sanidade Animal e Produção Animal e Segurança Alimentar.

Ao meu colega Tiago Touret. Obrigada por partilhares este ano comigo, pela ajuda ao longo do trabalho, pela amizade, por todas as peripécias vividas durante o mesmo, pela preocupação e alegrias. Juntos formámos uma boa equipa. Obrigada por tudo!

À Carina Matias (obrigada pela ajuda, disponibilidade e paciência) e ao Zé Caeiro por me terem dado momentos divertidos neste período e pela vossa amizade.

À Carla Carneiro por toda a ajuda e incentivo.

À Maria João e à Vanessa Martins que me apoiaram na realização de técnicas experimentais da dissertação.

À Ana Patrícia que deu sempre bons conselhos.

À minha amiga especial do coração, Inês Vaz, que me auxiliou sempre que precisei, tendo sido uma pessoa em quem pude sempre confiar e desabafar. Muito obrigada por me teres ajudado nesta fase importante da minha vida, com a tua presença e as tuas críticas. Vais estar sempre no meu coração e obrigada por me ouvires quando mais precisei.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio na conclusão do trabalho, incluindo as horas intermináveis de escrita e preocupações. Obrigada! Vão estar sempre no meu coração para o resto da minha vida. E obrigada por existirem. Sempre me deram incentivo, apoio, amor e toda a força de que necessitei.

Muito Obrigada a todos!

Comunicações apresentadas no âmbito da dissertação

Marques I, Touret T, Barreto AS, Tavares L, Semedo-Lemsaddek T, Oliveira M. 2015. Characterization of enterococci isolated from conventional and organic vegetables, P141. MicroBiotec 2015. Évora, Portugal. 1-3 dezembro.

Marques I, Oliveira M, Tavares L, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2015. *Aeromonas* isolated from non-organic vegetables present high resistance to antimicrobials, P142. MicroBiotec 2015. Évora, Portugal. 1-3 dezembro.

Comunicações apresentadas no âmbito da participação noutras atividades de investigação a decorrer no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV

Pinto da Costa MJ, Semedo-Lemsaddek T, Lajas M, Waiti E, **Marques I**, Lucas J, Freire D, Begg C, Begg K, Tavares L, Oliveira M. 2016. Perfil de virulência e de resistência a antibióticos de *Enterococcus* isolados a partir de amostras fecais de leões (*Panthera leo* Linnaeus, 1758) da Reserva Nacional do Niassa, norte de Moçambique. V Congresso da Ordem dos Biólogos / I Cimeira Ibérica de Biólogos. Évora, Portugal. 7-9 de abril

Touret T, **Marques I**, Tadeu F, Barreto AS, Tavares L, Semedo-Lemsaddek T, Oliveira M. 2015. Sauerkraut fermentations as a source of probiotic bacteria, P82. MicroBiotec 2015. Évora, Portugal. 1-3 dezembro.

Resumo

Os membros dos géneros *Aeromonas* e *Enterococcus* são reconhecidos como microrganismos potencialmente patogénicos causadores de doenças em humanos e animais, maioritariamente gastroenterites e infeções urinárias. Paralelamente, sabe-se que os consumidores procuram cada vez com maior frequência produtos hortícolas de origem biológica, onde estes microrganismos podem estar presentes. Assim, neste estudo foi avaliada a presença e a diversidade de *Aeromonas* e *Enterococcus* em diferentes produtos hortícolas, produzidos por agricultura biológica e convencional.

Após isolamento e caracterização fenotípica/genotípica dos microrganismos, obtivemos 26 isolados de *Aeromonas* spp. (13 obtidos de produtos de agricultura biológica *versus* 13 de produtos de agricultura convencional) e 78 isolados de *Enterococcus* spp. (34 obtidos de produtos de agricultura biológica *versus* 44 de produtos de agricultura convencional). De seguida, os isolados foram submetidos à técnica de *PCR-fingerprinting*, para a fazer a avaliação da diversidade genómica da colecção de microrganismos em estudo.

Após análise dos perfis obtidos, utilizando o *software* *Bionumerics*® e a construção de dendrogramas, foi possível seleccionar isolados, genomicamente distintos, como representantes da diversidade observada nos produtos analisados. Os microrganismos seleccionados (20 aeromonas e 54 enterococos) foram então avaliados quanto ao nível de suscetibilidade a vários agentes antimicrobianos e capacidade de produção de fatores de virulência.

Quanto à resistência a agentes antimicrobianos, no geral observaram-se níveis reduzidos de resistência, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas origens de isolados em estudo (agricultura biológica *versus* agricultura convencional). No entanto, detectaram-se quatro isolados de aeromonas e três isolados de enterococos multirresistentes, facto de extrema relevância que deve ser tido em consideração.

Relativamente à produção de fatores de virulência, a maioria dos isolados do género *Aeromonas* revelaram a capacidade de produzir DNase e lipase (tal como relatado noutros estudos), enquanto cerca de metade dos enterococos em estudo produziram hemolisina (considerado o fator de virulência mais importante deste género bacteriano).

Em conclusão, neste estudo detetou-se a presença de *Aeromonas* spp. e *Enterococcus* spp. nos produtos hortícolas em análise, independentemente da origem (agricultura biológica *versus* agricultura convencional). O facto de terem sido identificados microrganismos multirresistentes e produtores de fatores de virulência, sugere que estudos futuros devem pesquisar e caracterizar ambos os géneros bacterianos em produtos alimentares, especialmente se esses produtos forem ingeridos crus.

Palavras-chaves: *Aeromonas* spp.; *Enterococcus* spp.; produtos hortícolas de agricultura biológica e convencional; suscetibilidade a agentes antimicrobianos; fatores de virulência.

Abstract

Members of the genus *Aeromonas* and *Enterococcus* are recognized as putatively pathogenic microorganisms responsible for causing diseases both in humans and animals, mainly gastroenteritis and urinary tract infections. Meanwhile, it is known that consumers demand for vegetables of organic origin, in which the aforementioned microorganisms can be present, is increasing worldwide. Thus, this study evaluated the presence and diversity of *Aeromonas* and *Enterococcus* present in different vegetables, produced by organic and conventional agriculture.

After isolation and phenotypic/genotypic characterization, we obtained 26 *Aeromonas* spp. (13 isolated from organic products *versus* 13 isolated from conventional farming products) and 78 *Enterococcus* spp. (34 isolates from organic products *versus* 44 isolated from conventional farming products). Then, the isolates were subjected to PCR-fingerprinting technique to evaluate the genomic diversity of the collection of microorganisms under study.

After analyzing the profiles obtained using the *BioNumerics*® software leading to the construction of dendrograms, it was possible to select genomically distinct isolates, as representatives of the diversity observed in the analyzed products. Then, the selected microorganisms (20 aeromonads and 54 enterococci) were evaluated regarding the level of susceptibility to various antimicrobial agents and production of virulence factors.

For resistance to antimicrobial agents, in general low levels of resistance were observed and no statistically significant differences were observed between the two origins under study (organic farming *versus* conventional farming). However, among the aeromonads four multiresistant phenotypes were observed as well as three multiresistant enterococci, these extremely important findings should not be overlooked.

Regarding the production of virulence factors, most isolates of the genus *Aeromonas* showed the ability to produce DNase, and lipase (as reported in other studies), while approximately half of the enterococci under study were hemolytic (hemolysin being considered the most important virulence factor for this bacterial genus).

Overall, this study detected the presence of *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in the vegetable products under investigation, regardless of the source (organic farming *versus* conventional farming). The fact multidrug-resistant microorganisms were detected, as well as bacteria with the ability to produce virulence factors, suggests that future studies should search and characterize both bacterial genera in food products, especially if those foodstuffs are meant to be ingested raw.

Keywords: *Aeromonas* spp.; *Enterococcus* spp.; vegetable products from organic and conventional agriculture; antimicrobial susceptibility; virulence factors.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Consumo de produtos hortícolas.....	1
1.2 Segurança alimentar e microbiota associada aos produtos hortícolas.....	2
1.3 Características gerais do género <i>Aeromonas</i>	2
1.3.1 Taxonomia	2
1.3.2 Ecologia	3
1.3.3 Patogenicidade	3
1.3.3.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.....	4
1.3.3.2 Fatores de virulência	4
1.4 Características gerais do género <i>Enterococcs</i>	4
1.4.1 Taxonomia	5
1.4.2 Ecologia	5
1.4.3 Patogenicidade	5
1.4.3.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.....	6
1.4.3.2 Fatores de virulência	6
2. Objetivos.....	7
3. Materiais e Métodos	8
3.1 Recolha/Processamento das amostras e isolamento bacteriano de produtos hortícolas.	8
3.2 Extração de DNA	10
3.3 Identificação ao nível de género.....	10
3.4 Análise da diversidade	11
3.5 Avaliação de patogenicidade.....	12
3.5.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos	12
3.5.2 Fatores de virulência	14
3.6 Análise estatística.....	15
4. Resultados e Discussão	16
4.1 Distribuição dos géneros bacterianos em estudo pelos produtos em análise	16
4.2 Identificação molecular ao nível do género dos isolados em estudo.....	18
4.3 Avaliação da diversidade.....	20
4.4 Avaliação da suscetibilidade dos isolados a agentes antimicrobianos	23
4.4.1 <i>Aeromonas</i> spp.	23
4.4.2 <i>Enterococcus</i> spp.	26
4.5 Fatores de virulência	29
4.5.1 Fatores de virulência em <i>Aeromonas</i> spp.	30
4.5.2 Fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp.	31
5. Conclusões	33
6. Referências.....	35

Índice de tabelas

Tabela 1 - <i>Primers</i> específicos utilizados nas reações de PCR para a identificação ao nível do género.....	11
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para avaliação de diversidade genómica dos isolados.....	12
Tabela 3 - Antibióticos, dose respetiva e limites de sensibilidade e resistência, utilizados na determinação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. em estudo. Os valores tabelados correspondem aos limites descrito no CLSI	13
Tabela 4 - Antibióticos, dose respetiva e limites de sensibilidade e resistência, utilizados na determinação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. em estudo. Os valores tabelados correspondem aos limites descritos no CLSI	14
Tabela 5 – Número de isolados obtidos para os géneros bacterianos em estudo.....	17
Tabela 6 – Número de isolados identificados dos géneros bacterianos em estudo, após confirmação por métodos moleculares.....	18
Tabela 7 – Número de isolados resistentes em <i>Aeromonas</i> spp.	23
Tabela 8 – Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo	25
Tabela 9 – Número de isolados resistentes em <i>Enterococcus</i> spp.....	26
Tabela 10 – Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo	29
Tabela 11 – Isolados produtores de fatores de virulência em <i>Aeromonas</i> spp.....	30
Tabela 12 – Isolados produtores de fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp.	32

Índice de figuras

Figura 1 - Consumo de produtos hortícolas frescos na Europa em milhões de toneladas.....	1
Figura 2 - Consumo bruto de produtos hortícolas em Portugal de 2008 a 2012	1
Figura 3 – Procedimento experimental.....	9
Figura 4 -Dendrograma obtido com base nos perfis de RAPD-PCR do <i>primer</i> 1281 do género <i>Aeromonas</i> para todos os isolados em estudo	21
Figura 5 – Dendrograma obtido com base nos perfis de RAPD-PCR dos <i>primers</i> (GTG) ₅ e OPC19 do género <i>Enterococcus</i> para todos os isolados em estudo.....	22

1.Introdução

1.1 Consumo de produtos hortícolas

Nos últimos anos tem-se vindo a verificar um aumento no consumo de produtos hortícolas na Europa, tendo atingido aproximadamente os 119 milhões de toneladas em 2014 (CBI Market e Intelligence, 2015).

Na Europa, o país na qual se regista maior consumo de produtos hortícolas frescos é a Itália, seguido da Espanha, Polónia, Alemanha, França, Roménia, Reino Unido, Grécia, Portugal e Bélgica (CBI Market e Intelligence, 2015) (**Figura 1**).

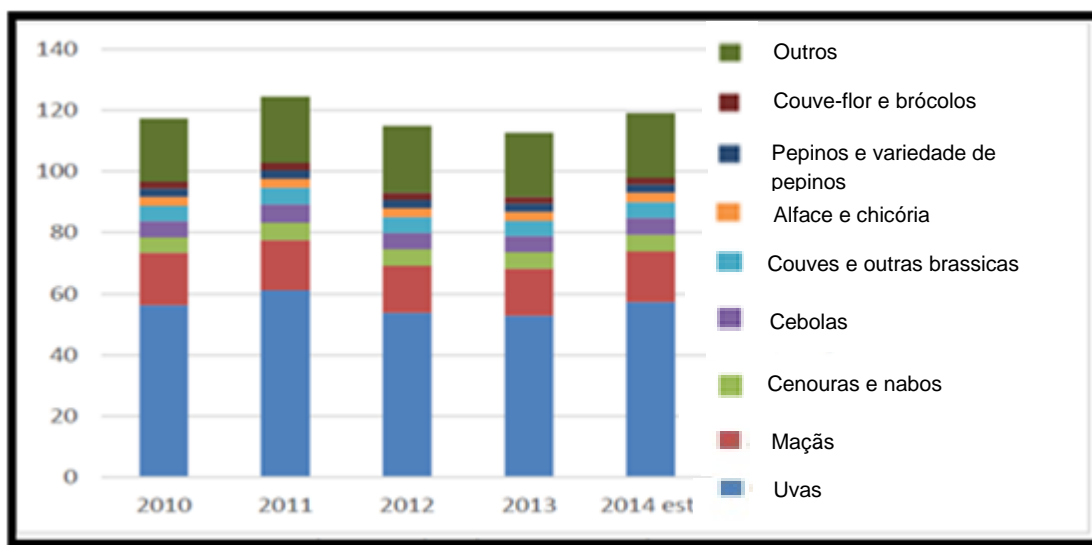


Figura 1 - Consumo de produtos hortícolas frescos na Europa em milhões de toneladas (Adaptado de: CBI Market e Intelligence, 2015).

Em Portugal, observa-se igualmente um aumento no consumo de produtos hortícolas frescos ao longo dos anos (INE, 2014) (**Figura 2**).

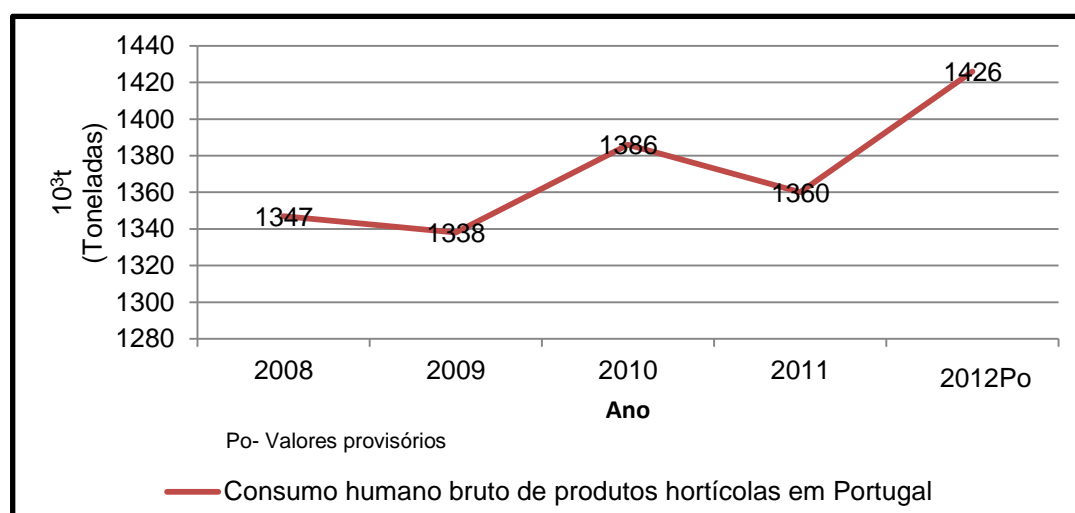


Figura 2 - Consumo bruto de produtos hortícolas em Portugal de 2008 a 2012 (Fonte: INE, 2014).

A captação de consumo dos produtos hortícolas depende das características sociodemográficas e do nível socioeconómico das populações (Moreira e Padrão, 2004), bem como dos seus padrões culturais (Epuru *et al.*, 2014). Vários estudos relacionaram o consumo dos produtos hortícolas com a disponibilidade e qualidade de vida das populações (Epuru *et al.*, 2014; Ribeiro, 2013; Santos *et al.*, 2014), contribuindo também para o aumento do consumo deste tipo de produtos.

1.2 Segurança alimentar e microbiota associada aos produtos hortícolas

A preocupação dos consumidores com questões relacionadas com a segurança alimentar, principalmente com a transmissão de microrganismos patogénicos através dos alimentos, tem vindo a aumentar (Philips, 2002). Os produtos hortícolas são um grupo particularmente relevante uma vez que podem estar sujeitos a contaminações durante a produção, a colheita, transporte e processamento (Ramos *et al.*, 2013; Ribeiro, 2013). No entanto, a microbiota de frutas e produtos hortícolas crus é constituída na sua maioria por microrganismos não patogénicos (Ramos *et al.*, 2013).

Entre os géneros bacterianos potencialmente patogénicos destacam-se as bactérias Gram negativas pertencentes ao género *Aeromonas* (Erdem *et al.*, 2011; Stratev *et al.*, 2012) e Gram positivas pertencentes ao género *Enterococcus* (Said *et al.*, 2015).

1.3 Características gerais do género *Aeromonas*

O género *Aeromonas* foi pela primeira vez descrito em 1954, associado ao isolamento de um microrganismo patogénico de humano, obtido a partir de amostras de sangue, pulmões, fígado, baço, urina e fluido cérebroespinal, de um doente com miosite metastática fulminante aguda (Parker e Shaw, 2011).

Este género é composto por bactérias Gram-negativas, com morfologia de bacilos retos, podendo ocorrer formas cocobacilares, com dimensões entre 0,3 µm a 1 µm x 1 a 3,5 µm. Algumas estirpes de *Aeromonas* têm a capacidade de se multiplicar a temperaturas inferiores a 0 °C em valores de pH compreendidos entre 4 e 10, mas a temperatura de multiplicação óptima é considerada entre os 22 °C e os 28 °C e na presença de altas concentrações de sal. Não são formadoras de esporos, são anaeróbias facultativas, móveis devido à presença de flagelos polares e oxidase e catalase positivas (Ghenghesh *et al.*, 2008; Igbinosa *et al.*, 2012; Parker e Shaw, 2011; Santos, 2012; Tomás, 2012).

De acordo com o “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, o género *Aeromonas* pode ser dividido em dois grupos principais. O primeiro grupo compreende as espécies mesofílicas móveis com temperatura óptima de multiplicação entre 35 °C e os 37 °C, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*. No segundo grupo encontram-se as espécies psicrófilas com temperatura óptima de multiplicação compreendida entre os 22 °C e os 25 °C e não móveis, tal como *A. salmonicida* (Parker e Shaw, 2011; Stratev *et al.*, 2012; Tomás, 2012).

1.3.1 Taxonomia

O género *Aeromonas* foi inicialmente incluído na família *Vibrionaceae*, uma vez que os seus elementos apresentam características próximas dos vibrios (Igbinosa *et al.*, 2012). Atualmente de acordo

com o “*Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*” os géneros *Vibrio* e *Photobacterium* pertencem à família *Vibrionaceae* e *Plesiomonas* pertence a família *Enterobacteriaceae* que pertencem à classe Gamma-proteobacteria (Parker and Shaw, 2011; Whitman *et al.*, 2015).

De acordo com Euzéby J.P. [<http://www.bacterio.cict.fr/a/Aeromonas.html>, último acesso em 23/09/2016] atualmente existem 35 espécies pertencentes ao género *Aeromonas*. No entanto, a taxonomia do género *Aeromonas* tem sofrido alterações ao longo dos tempos, devido à inclusão de novas espécies e à reclassificação do taxa preexistente (Igbinosa *et al.*, 2012).

1.3.2 Ecologia

As bactérias do género *Aeromonas* estão presentes em ambientes muito variados, podendo ser isoladas a partir da água (Piotrowska e Popowska, 2015) incluindo a água de consumo, do solo (Janda e Abbott, 2010), de organismos vivos como por exemplo mamíferos, peixes, invertebrados, aves, insectos, e também a partir de alimentos (Piotrowska e Popowska, 2015).

Encontra-se descrito o isolamento de *Aeromonas* a partir de diversos tipos de alimentos, tais como carne, peixe, frutos do mar e produtos hortícolas (Tomás, 2012), consumidos crus (Ghenghesh *et al.*, 2008) ou processados (Tomás, 2012) e obtidos tanto a partir de grandes como de pequenas superfícies comerciais (Janda e Abbott, 2010).

A presença de *Aeromonas* em produtos hortícolas frescos tem sido descrita em vários estudos (Chopra, 2008; Mohammed *et al.*, 2013; Palú *et al.*, 2006). A presença de *Aeromonas* em produtos hortícolas é considerada um risco para a saúde dos consumidores devido ao seu potencial de patogenicidade e a sua capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (McMahon e Wilson, 2001).

Aeromonas spp. citotóxicas foram isoladas a partir de várias espécies de produtos hortícolas, tais como salsa, espinafres, aipo, alface, couve, brócolos, pimento, tomate, couve-flor, courgette, nabo, agrião (Dhiraputra *et al.*, 2005; Heaton e Jones, 2008; Monge *et al.*, 1998).

Relativamente ao modo de cultivo, vários estudos referem que os produtos hortícolas de agricultura biológica apresentam uma maior probabilidade de contaminação por *Aeromonas*, em comparação com produtos hortícolas de agricultura convencional (Dhiraputra *et al.*, 2005; Heaton e Jones, 2008).

1.3.3 Patogenicidade

Algumas espécies, tais como *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, podem provocar doenças em humanos como gastroenterite (a mais prevalente), meningite, bacteremia, peritonite, infeções broncopulmonares e septicémia (Aziz *et al.*, 2004; Barroco, 2013; Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Parker e Shaw, 2011; Stratev *et al.*, 2012; Tomás, 2012). Apesar da incidência de doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados com *Aeromonas* ser observada em diferentes partes do mundo, os países em desenvolvimento constituem regiões de risco, devido às más condições de higiene e qualidade da água (Odeyemi e Ahmad, 2013).

1.3.3.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

O aumento da resistência aos agentes antimicrobianos por parte de bactérias do género *Aeromonas* tem sido descrita ao longo de vários anos, demonstrando-se a emergência de resistência entre *Aeromonas* spp. obtidas a partir de amostras clínicas, ambientais e alimentares (Alcaide *et al.*, 2010), devido à disseminação de genes de resistência por eventos de transferência horizontal (Quendera, 2014).

As bactérias do género *Aeromonas* são intrinsecamente resistentes a compostos pertencentes à classe dos β -Lactâmicos, tais como penicilina, ampicilina, carbenecilina e ticarcilina (Igbinosa *et al.*, 2012; Quendera, 2014), e apresentam níveis elevados de resistência às cefalosporinas de primeira e segunda geração (Castelo-Branco *et al.*, 2015). A maioria são susceptíveis às cefalosporinas de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e trimetoprim-sulfametoxazol. Estas bactérias podem ainda apresentar perfis de multirresistência (Yano *et al.*, 2015).

1.3.3.2 Fatores de virulência

O papel dos fatores de virulência de *Aeromonas* não se encontra completamente compreendido, embora esteja descrita uma elevada diversidade de fatores que provavelmente têm um papel importante no processo da infeção do hospedeiro (Piotrowska e Popowska, 2015). Algumas espécies de *Aeromonas* spp. conseguem produzir uma grande diversidade de enzimas extracelulares incluindo hemolisinas, proteases, lipases, DNase e leucocidinas entre outras (Barroco, 2013; Das *et al.*, 2013; Parker e Shaw, 2011).

Por outro lado possuem flagelos, *pili* e adesinas, estruturas envolvidas no processo de adesão, assim como cápsula e lipopolissacarídeos, envolvidos no processo de evasão aos mecanismos de defesa inata e adquirida do hospedeiro (Barroco, 2013; Igbinosa *et al.*, 2012; Tomás, 2012).

É importante referir que os isolados provenientes de amostras de alimentos também podem apresentar propriedades hemolíticas, citotóxicas e enterotoxinogénicas, podendo constituir um risco para a saúde do consumidor (Stratev *et al.*, 2012).

1.4 Características gerais do género *Enterococcus*

Os enterococos foram descritos pela primeira vez no final do século XIX (Tyne *et al.*, 2013) como diplococos Gram-positivos, para os quais foi proposto o nome "*Enterocoque*", de modo a enaltecer a sua morfologia e origem intestinal (Lebreton *et al.*, 2014).

A sua morfologia pode ser variável, em forma de cocos, individualizados, em cadeias pequenas ou aos pares. Não são formadoras de esporos possuem baixo conteúdo guanina-citosina (GC) e são anaeróbios facultativos.

Estes microrganismos são catalase negativos (apesar de algumas estirpes produzirem pseudocatalase) e oxidase negativos e têm a capacidade de se multiplicar em meios até 6,5 % NaCl e até um pH 9,6. Hidrolisam a esculina na presença de 40 % de sais biliares, a uma temperatura óptima de 35 °C, sendo que tais características auxiliam na sua identificação (Gomes *et al.* 2010, Lebreton *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2014; Said *et al.*, 2015; Santos, 2011; Tyne *et al.*, 2013).

1.4.1 Taxonomia

Inicialmente designados como *Streptococcus faecalis* e *S. faecium* as espécies mais prevalentes do género *Enterococcus* foram reclassificadas num novo género em 1984, com base em resultados obtidos por hibridização DNA-DNA e rDNA-DNA. *Enterococcus* pertencem à família *Enterococcaceae* (Lebreton *et al.*, 2014; Quendera, 2014). De acordo com Euzéby J.P. [<http://www.bacterio.cict.fr/e/Enterococcus.html>, último acesso em 23/09/2016] atualmente existem 55 espécies pertencentes ao género *Enterococcus*. No entanto, este género não se encontra completamente compreendido do ponto de vista taxonómico, e estudos futuros poderão originar novas reclassificações (Santos, 2012).

1.4.2 Ecologia

Enterococcus são considerados microrganismos indicadores de contaminação fecal de origem humana, uma vez que são comensais do ecossistema intestinal de origem humana e animal no ambiente, sendo que a sua ubiquidade está relacionada com a sua flexibilidade e capacidade de resistência a condições adversas (Lebreton *et al.*, 2014; Santos, 2011). Assim, encontram-se frequentemente associados a vários tipos de ambientes aquáticos, incluindo água doce ou salgada, e também de ambientes terrestres, (Moses e Oluwaniyi, 2015). Já foram isoladas a partir destes alimentos tais como produtos hortícolas, carne, carnes fermentadas e lacticínios, sendo que algumas estirpes apresentam benefícios e influenciam o sabor e o aroma de alguns queijos (Lebreton *et al.*, 2014; Quendera, 2014).

Relativamente aos produtos hortícolas, o género *Enterococcus* spp. já foi isolado a partir de diversos produtos (Bellei *et al.*, 2011; Lebreton *et al.*, 2014), tais como cenoura., aipo, pepino, salsa, tomate, alface, cebola, batata, couve-flor e espinafre (Kaur e Rai, 2015; McGowan *et al.*, 2006). Outro estudo refere ainda a presença de bactérias pertencentes a esse género em produtos hortícolas, tanto ao nível da produção como a nível da comercialização (Said *et al.*, 2015).

1.4.3 Patogenicidade

As bactérias do género *Enterococcus* foram estabelecidas como um dos principais agentes responsáveis por infeções nosocomiais desde 1970 (Santos, 2011). Apesar de geralmente serem consideradas comensais do trato gastrointestinal de omnívoros animais e humanos, estas bactérias podem disseminar-se para outras localizações no organismo do hospedeiro, originando doenças graves, como por exemplo septicémia (Lebreton *et al.*, 2014), infeções intra-abdominais e do sistema nervoso central (Santos, 2012). Atualmente é considerado como um dos microrganismos multirresistentes mais prevalentes (Tyne *et al.*, 2013) em pacientes hospitalizados com doenças subjacentes graves, indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos (Santos, 2011).

1.4.3.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

O desenvolvimento de infecções em humanos causadas por bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* é influenciado pela capacidade destas escaparem à ação dos antibióticos mais frequentemente utilizados na terapêutica antimicrobiana (Hollenbeck e Rice, 2012). Mas a resistência a antibióticos não é observada apenas em isolados clínicos, mas também em isolados do trato intestinal de humanos saudáveis, de animais para consumo humano e de alimentos, o que constituiu uma grande preocupação em termos de saúde pública (Santos, 2012). As bactérias do género *Enterococcus* têm ainda a capacidade de adquirir genes de resistência a determinados agentes antimicrobianos, através de conjugação, transformação ou transdução (Said *et al.*, 2015; Santos, 2012). Assim, a resistência aos agentes antimicrobianos pode ser considerada intrínseca ou adquirida. A resistência a β -lactâmicos, lincosamidas, estreptograminas, trimetoprim-sulfametoxazol e a baixas concentrações de aminoglicosídeos é considerada intrínseca, enquanto a resistência a compostos tais como os aminoglicosídeos, níveis elevados de glicopéptidos, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol e quinolonas é considerada adquirida (Quendera, 2014).

Enterococcus apresentam resistência a um grande número de compostos pertencentes à maioria das classes dos agentes antimicrobianos (Willems *et al.*, 2012). O perfil de multirresistência destas bactérias tem sido atribuído ao uso indevido e excessivo de antibióticos na prática clínica humana e veterinária, bem como à utilização de biocidas ou pesticidas na agricultura. Uma vez que apresentam resistência a uma grande variedade de antibióticos, as alternativas terapêuticas para tratamento das infecções promovidas por *Enterococcus* são cada vez menores (Fernández-Fuentes *et al.*, 2014; Radhouani *et al.*, 2014).

1.4.3.2 Fatores de virulência

O potencial de virulência dos *Enterococcus* depende também da presença de determinantes de virulência no seu genoma (Santos, 2012).

Os fatores de virulência expressos por estas bactérias que contribuem para a sua patogenicidade incluem citolisinas, substâncias de agregação, adesinas e enzimas hidrolíticas, tais como gelatinase e hemolisinas, assim como a produção de superóxido desmutase e hialuronidase (Abriouel *et al.*, 2008; Hashem *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2006; Quendera, 2014; Upadhyaya *et al.*, 2009). Estes fatores de virulência já foram detetados em estirpes clínicas, mas também em isolados de origem ambiental, animal e alimentar e em água não tratada (Quendera, 2014).

Uma vez que estes podem ser isolados a partir de alimentos, estes fatores constituem uma grande preocupação, não só pelo facto de estes isolados potencialmente patogénicos poderem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, mas também pelo potencial de transmissão de fatores de virulência para outros géneros bacterianos por transferência horizontal de genes (Semedo *et al.*, 2003). No entanto, é importante salientar que a relação entre o consumo de alimentos contaminados com *Enterococcus* e o desenvolvimento de doença ainda não se encontra completamente estabelecida (Santos, 2012).

2. Objetivos

O consumo de produtos hortícolas tem aumentado como parte essencial de uma alimentação saudável e, hoje em dia, os consumidores têm a tendência de escolher alimentos de origem biológica por várias razões, tais como a sustentabilidade do meio ambiente e o menor uso de fertilizantes e pesticidas, comparativamente aos alimentos convencionais (Smith-Spangler *et al.*, 2012).

Entre os alimentos que podem ser veículos de agentes potencialmente patogénicos, destacam-se os produtos hortícolas, uma vez que são frequentemente consumidos crus ou insuficientemente processados.

Os produtos hortícolas podem ser contaminados por diferentes microrganismos patogénicos, incluindo bactérias pertencentes ao género *Aeromonas* através do contato com água contaminada e *Enterococcus*, através da contaminação fecal e manipulação indevida de alimentos.

O objetivo principal deste estudo foi pesquisar, a presença de microrganismos potencialmente patogénicos pertencentes aos géneros *Aeromonas* e *Enterococcus* em produtos hortícolas de origem biológica e convencional (brócolos, cenoura, couve coração, couve portuguesa, espinafres e pimento verde), estabelecendo-se as seguintes tarefas:

- Isolamento em meios de cultura seletivos e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados obtidos pertencentes aos géneros *Aeromonas* e *Enterococcus*.
- Caracterização da suscetibilidade desses mesmos isolados a agentes antimicrobianos pertencentes às classes (e.g. β lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol).
- Caracterização fenotípica dos isolados quanto à sua capacidade de produção de fatores de virulência (DNase, gelatinase, hemolisina e lipase).

3. Materiais e Métodos

3.1 Recolha/Processamento das amostras e isolamento bacteriano de produtos hortícolas

Foram recolhidos e analisados um total de 14 produtos hortícolas incluindo, sete produtos hortícolas biológicos provenientes de uma Herdade localizada no Alentejo e sete amostras de produtos hortícolas convencionais provenientes de uma grande superfície comercial. Os produtos amostrados foram os seguintes: brócolos (n=2), cenoura (n=2), couve coração (n=2), couve portuguesa (n=2), espinafres (n=2), pimento verde (n=2) e tomate (n=2).

Após recolha, procedeu-se à análise das amostras com vista ao isolamento de microrganismos. Para tal, foi realizada uma pesagem de 25 g de cada produto para suspensão em 225 ml de APT (água peptonada tamponada, VWR®, Estados Unidos da América e Canada) NP2079 (1989). A suspensão foi homogeneizada no aparelho de Stomacher 400® durante 1 minuto e 30 segundos, após o que foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, foram realizadas duas diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}), procedendo-se à sementeira por espalhamento de 100 µl de cada diluição para os seguintes meios de cultura seletivos: *Pseudomonas Aeromonas selective Agar* suplementado com 100 IU/ml de penicilina G (GSP (*Glutamate Starch Phenol-Red Agar*) - MERCK®, Estados Unidos da América e Canada) e *Slanetz Bartley Agar* suplementado com 1% de cloreto de trifetil tetrazólico (TTC) (50 mg) (SBA - MERCK®, Estados Unidos da América e Canada). As sementeiras realizadas em GSP foram incubadas a 30 °C durante 24 horas, enquanto as realizadas em SBA foram incubadas a 37 °C durante 48 horas.

Após incubação foi observado a multiplicação de várias colónias amarelas características de *Aeromonas* spp. no meio GSP e colónias cor de vinho características de enterococos, no meio SBA. Nas placas em que não se observou multiplicação foi realizada nova sementeira a partir do enriquecimento da suspensão inicial, incubada a 30 °C durante 24 horas.

Após incubação, foram selecionadas 5 colónias características a partir de cada um dos meios seletivos, realizou-se posteriormente quatro purificações sucessivas, a última das quais em BHI agar (*Brain Heart Infusion Agar*, VWR ®). Os isolados foram conservados em APT com glicerol a 20% (-80°C) e em picada central (+4 °C).

Para a identificação presuntiva de *Enterococcus* spp., foi realizado o teste da esculina. Desta forma, foi selecionada uma colónia que foi posteriormente semeada em meio de esculina (*Bile Esculin Azide Agar*, Scharlau, Espanha), sendo considerados como *Enterococcus* spp. os isolados que apresentavam halo preto após incubação. De seguida, foi realizada coloração de Gram, bem como os testes de oxidase e catalase (Madigan *et al.*, 2010) para os isolados presuntivamente identificados como *Aeromonas* spp. e *Enterococcus* spp.

O resumo do procedimento experimental utilizado encontra-se ilustrado na **Figura 3**.

Produtos hortícolas biológicos

Produtos hortícolas convencionais

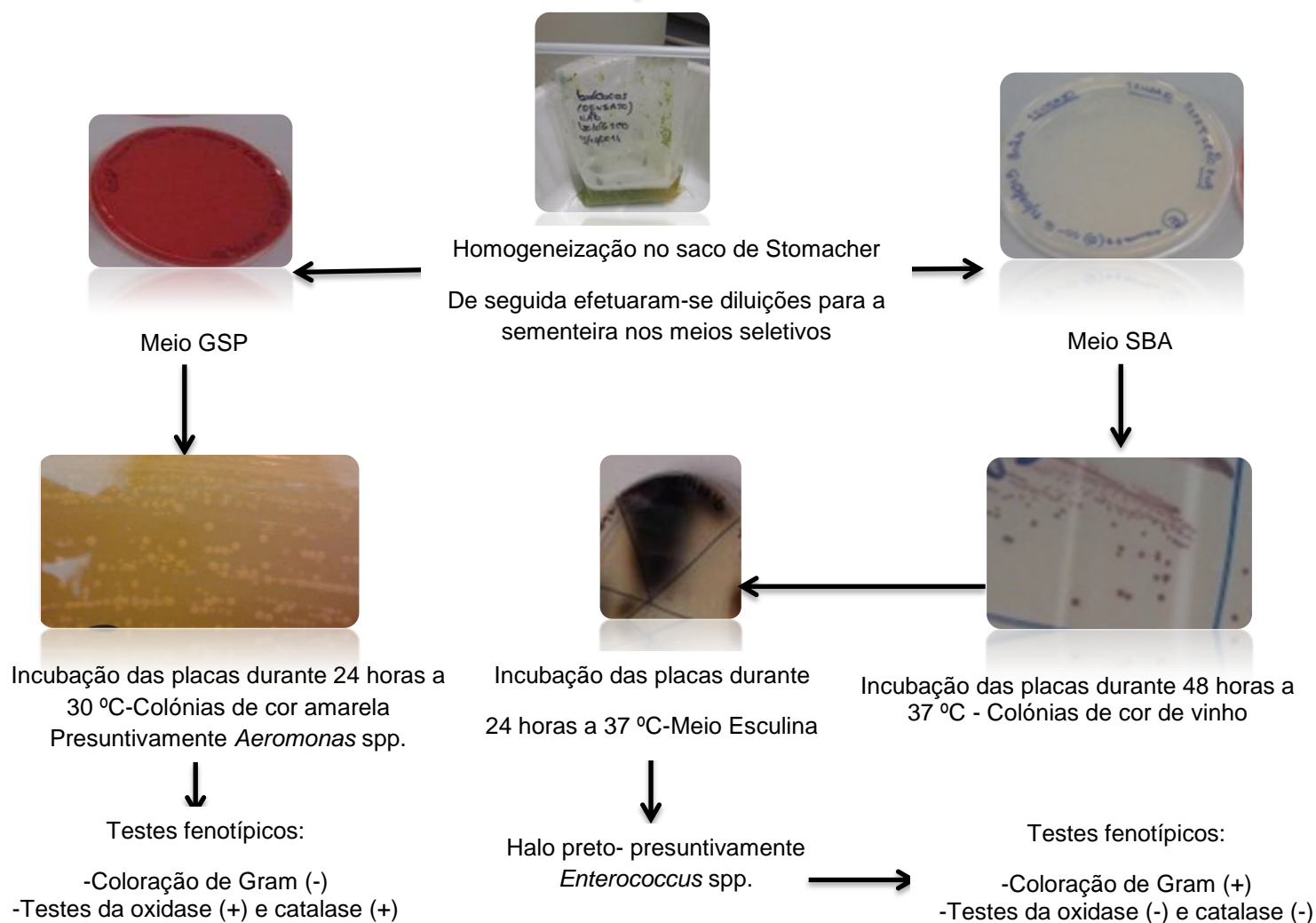


Figura 3 – Procedimento experimental

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados foi realizada através do método de fervura (Iweriebor *et al.*, 2015). Após multiplicação a uma incubação de 18-24 horas preparou-se uma suspensão bacteriana em 50 µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0) + 0,1% Tween 20 (Merck®), que foi incubada 10 minutos a 100 °C, seguida de colocação em gelo. Em seguida as suspensões foram centrifugadas durante 2 minutos a 14000 rpm (Hermle ® Z233 MK-2). O sobrenadante foi então recolhido para um novo tubo e conservado a – 20 °C até utilização futura.

3.3 Identificação ao nível de género

A identificação ao nível de género dos isolados suspeitos de pertencerem ao género *Aeromonas* foi realizada com base na pesquisa dos genes *gcat* (gene que codifica para o glicerofosfolipidocolesterol aciltransferase) e RNA ribossomal 16S (Puthucheary *et al.*, 2012; Marques, 2011) através da metodologia de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase). A reação foi realizada num volume final de 20 µl, incluindo 10 µl de *supreme NZYTaQ 2x green Master mix* (NZYTech®, Lumiar, Lisboa, Portugal), 8 µl de água estéril, 1 µl de *primer* e 1 µl de DNA (ver **Tabela 1**).

A reação de amplificação foi realizada num termociclador (Doppio, VWR®, Radner, Pensilvânia, Estados Unidos da América) recorrendo ao programa: etapa de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos consistindo em desnaturação a 94 °C durante 15 segundos, hibridação a 60 °C durante 45 segundos e elongação a 72 °C durante 45 segundos, e finalmente uma etapa de extensão a 72 °C durante 5 minutos, seguida de refrigeração a 4 °C.

Nesta fase foram utilizadas como controlo positivo as seguintes estirpes: *Aeromonas* sp. (A3), *A. hydrophila* (A259), *A. hydrophila* DSMZ 30187^T e *A. caviae* (S5) e o controlo negativo (água em substituição de DNA) (Barroco, 2013).

A identificação ao nível de género de *Enterococcus* foi baseada na pesquisa do gene *tuf* (que codifica o fator de elongação) (Ke *et al.*, 1999). A reação de PCR foi realizado num volume final de 20 µl, incluindo 10 µl *supreme NZYTaQ 2x green Master mix* (NZYTech®), 8 µl de água estéril, 1 µl de cada *primer* e 1 µl de DNA (ver **Tabela 1**).

O programa utilizado para amplificação incluiu um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos incluindo uma desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, hibridação a 48 °C durante 1 minuto e elongação a 72 °C durante 1 minuto, posteriormente, finalizando-se com uma fase de extensão a 72 °C durante 5 minutos, seguida de refrigeração a 4 °C.

No PCR foram incluídas as seguintes estirpes controlo positivo: *Enterococcus faecalis* (V583), *Enterococcus faecalis* (3L1.2), *Enterococcus faecalis* (7C1.4) e *Enterococcus faecalis* (U1881) e controlo negativo (água em substituição de DNA) (Quendera, 2014).

Os produtos de amplificação das reações de PCR realizadas para a identificação ao nível de género, tanto de *Aeromonas* spp. como de *Enterococcus* spp., foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em TBE 0.5X (0,1M Tris, 0,1M de ácido bórico, 0,2mM EDTA), na qual foi utilizado o marcador *NZYDNA VIII* (NZYTech®). No gel colocou-se 10 µl de cada uma das amostras e 5 µl *NZYDNA ladder VIII* (NZYTech®) com 2 µl de GelRed (iNtRON Biotechnology®, Coreia) nas amostras. O gel foi

submetido a uma electroforese com uma corrida de 2 horas a voltagem de 120 V. A presença dos produtos de PCR no gel foi visualizada através do sistema de imagem *ImageMaster* (Pharmacia, Biotech, GE Healthore, Reino Unido).

Tabela 1 -*Primers* específicos utilizados nas reações de PCR para a identificação ao nível do género.

Géneros bacterianos	Gene (<i>locus</i>)	Sequências dos <i>primers</i> (5´-3´) (STABVIDA®)	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>Aeromonas</i>	<i>gcat</i>	F- CTCCTGGAATCCAAGTATCAG	237	Chacón <i>et al.</i> , 2002
		R - GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT		
	rRNA 16S	F - ACGCAGGCGGTTGGATAAGT	521	Marques, 2011
		R - GGCAACAAAGGACAGGGT		
<i>Enterococcus</i>	<i>Tuf</i>	F- TACTGACAAACGATTCATGATG	112	Ke <i>et al.</i> , 1999
		R - AACTTCGTCACAACGCGAAC		

Legenda: F-Forward; R- Reverse

3.4 Análise da diversidade

Nesta análise foram utilizados os *primers* M13 e 1281 (STABVIDA®, Caparica, Portugal) (ver **Tabela 2**). A reação de PCR foi realizada num volume final de 20 µl, incluindo 10 µl de *supreme NZYtaq 2x Green Master Mix* (NZYTech®), 8 µl de água estéril, 1 µl de cada *primer* e 1 µl de DNA.

A amplificação de produtos de PCR foi realizada através de um termociclador (Doppio, VWR®, Radner, Pensilvânia, Estados Unidos da América), usando as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo num passo de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, hibridação a 40°C durante 2 minutos e de elongação a 72 °C durante 2 minutos terminando com uma fase de extensão a 72°C durante 10 minutos, seguido de refrigeração a 4 °C.

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,2 % em TBE 0,5X, durante 2 horas e 45 minutos à voltagem de 120 V, para separação de 10 µl de amostra e 5 µl de *NZYDNA ladder VIII* (NZYTech®) com 2 µl de GelRed (iNtRON Biotechnology®) nas amostras aplicadas nos poços. A imagem foi capturada através do sistema de imagem *ImageMaster*.

Para a análise da diversidade genómica de *Aeromonas* spp., utilizou-se o *software BioNumeric®* (versão 6.6.5, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), através do qual foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para a análise de semelhança entre os perfis obtidos, permitindo a construção de dendrogramas através do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). O nível de reprodutibilidade da técnica foi aferido através da análise de 10% de réplicas (escolhidas aleatoriamente).

Para a análise de diversidade genómica de *Enterococcus* spp. foram utilizados os seguintes *primers*: (GTG)₅ e OPC19 (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2013). A reação foi realizada num volume final de 20

µl, incluindo 10 µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix* (NZYTech®), 8 µl de água estéril, 1 µl de *primer* e 1 µl de DNA (ver **Tabela 2**). Para amplificação, visualização e análise dos perfis de PCR, foi utilizado o protocolo anteriormente descrito para *Aeromonas* spp.

Tabela 2- *Primers* utilizados para avaliação de diversidade genómica dos isolados.

Géneros bacterianos	<i>Primers</i> (STABVIDA®)	Sequência dos <i>primers</i> (5´-3´)	Tamanho dos produtos (pb)	Referências
<i>Aeromonas</i>	M13	GAGGGTGGCGGTTCT]200-3000[Hsueh <i>et al.</i> , 1999
	1281	AACGCGCAAC]200-3000[Sinha <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterococcus</i>	(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG]200-3000[Semedo- Lemsaddek <i>et al.</i> , 2013
	OPC19	GTTGCCAGCC]200-3000[Semedo- Lemsaddek <i>et al.</i> , 2013

3.5 Avaliação de patogenicidade

3.5.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

Para elaboração do teste de sensibilidade dos isolados de *Aeromonas* (n=20) e de *Enterococcus* (n=54) a antibióticos é necessária a obtenção de uma cultura pura numa placa de BHI. Com uma zaragatoa estéril retirou-se cultura suficiente para realizar uma suspensão num tubo com 7 ml de soro fisiológico, de forma a obter uma turvação de 0,5 na escala de McFarland (concentração ≈ a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Em seguida, inoculou-se com a mesma zaragatoa, a totalidade da superfície seca de uma placa de BHI. Este processo foi repetido mais duas vezes rodeando a placa aproximadamente 90 °, de forma a conseguir uma distribuição uniforme do inóculo pela superfície da placa. Quando a absorção do inóculo se concluiu, colocou-se com o auxílio de uma pinça estéril os discos impregnados de antibiótico. A escolha dos antibióticos a testar depende do tipo de microrganismos em estudo.

As placas foram incubadas durante 24 horas, a 30 °C para *Aeromonas* e a 37°C para *Enterococcus*, após incubação mediu-se o diâmetro dos halos de inibição promovidos por cada disco. Os valores obtidos foram comparados com valores tabelados que nos permite distinguir os isolados como sensíveis, intermédios ou resistentes a esses compostos antimicrobianos (ver **Tabela 3 e 4**). A interpretação dos perfis de sensibilidade foi realizada de acordo com os limites de suscetibilidade e resistência definidos para *Aeromonas* (norma M45-A 2006) pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*), sendo que,

para o ácido nalidixíco foram usados os intervalos para *Enterobacteriaceae* definidos pela norma M100-S23 (2013) do CLSI (ver **Tabela 3**).

Para os isolados de *Enterococcus* os limites utilizados foram os definidos na norma M100-S23 (2013) do CLSI, com exceção do antibiótico B, em que os halos de inibição não estão definidos para enterococos. Neste caso, foram considerados os limites estabelecidos pelo laboratório *Safoni* (1994) (ver **Tabela 4**). No caso do antibiótico VA foi determinada a concentração mínima inibitória (OXOID®, Basingstoke, Reino Unido) através da realização do E-test, que consistiu inocular o microrganismo a partir de cultura pura em meio BHI agar, preparando-se uma suspensão com soro fisiológico do microrganismo a analisar, correspondente a um grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland e, posteriormente, com uma zaragatoa embebida nas suspensões, inoculou-se por espalhamento no meio de cultura. Seguidamente utilizando uma pinça estéril, colocou-se uma fita filtro do antibiótico VA contendo diferentes concentrações. A leitura das concentrações mínimas inibitórias foi realizada após a incubação em anaerobiose a 37 °C durante 24 horas e a sua interpretação foi segundo as instruções do fabricante.

Tabela 3 - Antibióticos, dose respetiva e limites de sensibilidade e resistência, utilizados na determinação de suscetibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados de *Aeromonas* spp. em estudo. Os valores tabelados correspondem aos limites descritos no CLSI.

Classes de Antibióticos	Antibióticos (Símbolos)	Dose	Limites (mm)		
			R	I	S
β- Lactâmicos e inibidores de β Lactamases	Amoxicilina - Ácido Clavulânico (AMC)	20/10 µg	≤13	14-17	≥18
	Cefotaxima (CTX)	30 µg	≤14	15-22	≥23
	Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤14	15-17	≥18
	Ertapenem (ETP)	10 µg	≤15	16-18	≥19
	Imipenem (IPM)	10 µg	≤13	14-15	≥16
	Aztreonam (ATM)	30 µg	≤15	16-21	≥22
Aminoglicosídeos	Amicacina (AK)	30 µg	≤14	15-16	≥17
	Gentamicina (CN)	10 µg	≤12	13-14	≥15
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE)	30 µg	≤14	15-18	≥19
Cloranfenicol	Cloranfenicol (C)	30µg	≤12	13-17	≥18
Quinolonas	Ácido Nalidíxico (NA)	30 µg	≤13	14-16	≥17
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤15	16-20	≥21
	Levofloxacina (LEV)	5 µg	≤13	14-16	≥17
Inibidores da via dos fosfatos	Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	1,25/23, 75 µg	≤10	11-15	≥16

Legenda. S-Suscetível; I-Intermédio; R-Resistente

Tabela 4- Antibióticos, dose respectiva e limites de sensibilidade e resistência, utilizados na determinação de suscetibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* spp. em estudo. Os valores tabelados correspondem aos limites descritos em CLSI.

Classes de Antibióticos	Antibióticos (Símbolos)	Dose	Limites (mm)		
			R	I	S
β- Lactâmicos e Inibidores das β lactamases	Amoxicilina – Ácido Clavulânico (AMC)	20/10 µg	6	-	20
	Ampicilina (AMP)	10 µg	≤16	-	≥17
	Penicilina G (P)	10 U	≤14	-	≥15
Glicopéptidos	Vancomicina (VA)	5 µg	≤14	15-16	≥17
	Teicoplanina (TEC)	30 µg	≤10	11-13	≥14
Polipéptidos	Bacitracina (B)	10 U	<15	-	≥15
Aminoglicosídeos	Estreptomicina (S)	300 µg	≤6	7-9	≥10
	Gentamicina (CN)	120 µg	≤6	7-9	≥10
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE)	30 µg	≤14	15-18	≥19
Oxazolidinonas	Linezolida (LZD)	30 µg	≤20	21-22	≥23
Cloranfenicol	Cloranfenicol (C)	30 µg	≤12	13-17	≥18
Macrólidos	Eritromicina (E)	15 µg	≤13	14-22	≥23
Estreptograminas	Quinupristina - Dalfopristina (QD)	15 µg	≤15	16-18	≥19
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤15	16-20	≥21
	Levofloxacina (LEV)	5 µg	≤13	14-16	≥17

Legenda: S - Suscetível, I: Intermédio; R: Resistente.

3.5.2 Fatores de virulência

A avaliação fenotípica da produção de fatores de virulência pelos isolados de *Aeromonas* (n=20) e *Enterococcus* (n=54), foi realizada após multiplicação em meios de cultura específicos.

O teste da gelatinase foi realizado utilizando meio de cultura *Gelatin Peptone Agar* (Liofilchem®, Itália) no qual foi feita sementeira por estria. Para *Aeromonas*, optou-se por multiplicação das colônias por incubação na estufa a 30 °C durante 24 horas, e adicionou-se uma solução de bicloreto de mercúrio a 15 %. Para *Enterococcus*, o teste da gelatinase foi realizado utilizando o meio de cultura *Skim-milk* (Difco-BD-Becton, Dickinson e Co®, Nova Jérсия), o que permitiu a obtenção de resultados após incubação na estufa a 37 °C após 24 a 48 horas. Em ambos os géneros, a produção de enzimas gelatinolíticas foi revelada pela formação de halos translúcidos.

O teste da lipase foi realizado usando o meio de cultura *Spirit Blue Agar* (Difco- BD- Becton, Dickinson e Co®), no qual foi realizada a sementeira por estria dos isolados selecionados. Os resultados foram observados após incubação a 30 °C durante 24 horas no caso de *Aeromonas*, enquanto para os

enterococos os resultados foram visualizados após incubação a 37 °C durante 48 horas. A formação de halos transparentes correspondentes à degradação dos lípidos presentes no meio de cultura foi considerado um resultado positivo.

O teste da hemólise foi realizado através do meio de cultura *Columbia agar* com 5% sangue de cavalo (Biogerm®, Moreira, Portugal), na qual foi feita sementeira dos isolados selecionados. Para *Aeromonas*, as placas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas, tendo que a incubação foi realizada em condições de aerobiose. Para *Enterococcus*, o teste foi realizado tal como descrito anteriormente, com a multiplicação dos isolados a 37 °C durante 48 horas em condições de anaerobiose utilizando um gerador de atmosfera modificada (VWR®). Os isolados β -hemolíticos deram origem a uma zona transparente à volta da colónia resultante da lise total dos eritrócitos, os isolados α -hemolíticos originaram um halo esverdeado correspondente à lise parcial dos eritrócitos, os isolados γ -hemolíticos caracterizaram-se pela ausência de capacidade hemolítica.

O teste da DNase foi realizado utilizando meio de cultura *DNase test agar* (Liofilchem®), no qual foi feita sementeira dos isolados. Para *Aeromonas*, as placas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas, enquanto para *Enterococcus* a incubação foi realizada a 37 °C durante 48 horas. Em ambos os casos, após incubação adicionou-se 0,1 % de azul de toluidina (Liofilchem®). A observação de um halo cor-de-rosa em redor das colónias correspondeu a um resultado positivo.

Para validação dos processos anteriores foram selecionados e analisados sob as mesmas condições 10% dos isolados selecionados aleatoriamente da coleção em estudo (3.3 a 3.5).

3.6 Análise estatística

Para avaliar a relação entre a suscetibilidade e a produção de fatores de virulência dos isolados de *Aeromonas* foi utilizado o teste de Fisher, uma vez que o número de isolados pertencentes a este género em estudo é menor comparativamente ao número de isolados de *Enterococcus*. No caso de *Enterococcus* obtidos a partir de produtos hortícolas de origem biológica e convencional foi utilizado o teste do qui-quadrado (Terkuran *et al.*, 2014). Usou-se o *software* estatístico designado *SPSS Statistic™ V21*.

4. Resultados e Discussão

Os produtos hortícolas são géneros alimentícios essenciais para a manutenção da saúde humana, sendo que o autor Kaur e Rai (2015) associou o seu consumo à prevenção de algumas doenças crónicas. O seu consumo tem vindo a aumentar, sendo que alguns destes são ingeridos crus, suscitando preocupações ao nível da segurança microbiológica (Moses e Oluwaniyi, 2015), uma vez que existem evidências da presença de microrganismos patogénicos como *Enterococcus* spp. e *Aeromonas* spp. nestes produtos (Das *et al.*, 2013; Pablos *et al.*, 2011; Said *et al.*, 2015; Venkataiah *et al.*, 2013).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *Aeromonas* spp. e *Enterococcus* spp. em produtos hortícolas provenientes de agricultura biológica e convencional, bem como caracterizar a antibiorresistência e virulência.

4.1 Distribuição dos géneros bacterianos em estudo pelos produtos em análise

Foram analisados os seguintes produtos hortícolas: brócolos, cenoura, couve coração, couve portuguesa, espinafres, pimento verde e tomate.

Para a pesquisa de *Aeromonas* spp., foi utilizado o meio seletivo *Pseudomonas Aeromonas seletive agar* (GSP) suplementado com penicilina, o qual após inoculação, foi incubado a 30 °C durante 24 horas. Este meio contém glutamato e amido que fornecem nutrientes necessários à multiplicação bacteriana. Embora muitos microrganismos não consigam degradar esses componentes (glutamato e amido), *Aeromonas* spp. consegue degradar o amido presente no meio com produção de ácido. A diminuição do pH causa a mudança da cor de vermelho para amarelo, devido à presença do indicador de pH (vermelho de fenol), permitindo diferenciar *Aeromonas* spp. de *Pseudomonas* spp., que embora cresçam neste meio não levam à mudança de cor (Tripathi e Choudhary, 2014).

Assim, foram selecionados e considerados presuntivamente como *Aeromonas* spp. os isolados que deram origem a colónias amarelas rodeadas por uma zona amarela. Foram selecionados 50 isolados provenientes de amostras de produtos hortícolas de agricultura biológica e convencional (os isolados foram obtidos a partir de amostras enriquecidas, sendo que não possível obter isolados a partir de todas as amostras analisadas, nomeadamente: couve coração, pimento verde e tomate). De seguida, foram realizados testes fenotípicos (coloração Gram, teste da oxidase e catalase), que permitiram selecionar os isolados que apresentavam coloração Gram-negativa e resultado positivo para os testes da catalase e oxidase, características das bactérias pertencentes ao género *Aeromonas* spp. Desta forma, foram obtidos 19 isolados provenientes de produtos hortícolas de origem biológica e 25 isolados com origem em produtos hortícolas de agricultura convencional perfazendo um total de 44 isolados identificados presuntivamente como pertencentes a este género (ver **Tabela 5**).

Para a pesquisa de *Enterococcus* foi utilizando o meio seletivo *Slanetz Bartley agar* (SBA), o qual contém azida de sódio, que inibe o multiplicação da microflora bacteriana Gram-negativa, e é suplementado com cloreto de trifetil tetrazólico (TTC), que serve como indicador do multiplicação bacteriano e que leva à mudança da cor das colónias para vermelho (por acumulação de um formazano insolúvel no interior das

células bacterianas). Contém ainda fontes suplementares de vitaminas, como o extrato de levedura e outros componentes, como o azoto, minerais e aminoácidos, que são fornecidos pela triptona; a glucose atua como fonte de carbono e o fosfato de dipotássio atua como agente solidificador. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas, obtendo-se colónia cor de vinho características de *Enterococcus* spp. (Slanetz e Bartley, 1975).

Os isolados selecionados foram posteriormente sujeitos ao teste da bÍlis-esculina e a análise fenotÍpica, incluindo a coloração de Gram, teste de oxidase e catalase. Foram identificados presuntivamente como pertencentes ao género *Enterococcus* spp., os isolados que apresentavam halo preto em redor das colónias no teste da bÍlis-esculina, coloração Gram-positiva e testes da catalase e oxidase negativos, tal como descrito por Abriouel *et al.* (2008) e Riboldi *et al.* (2009). Assim, foram selecionados 95 isolados presuntivamente identificados como *Enterococcus* spp., dos quais apenas os isolados da couve portuguesa e do tomate de agricultura biológica foram obtidos sem enriquecimento, enquanto os restantes enterococos foram recolhidos a partir de amostras enriquecidas, sendo que não foi possível obter isolados a partir de amostras de cenoura. Cerca de 41 isolados tiveram origem em produtos hortÍcolas de agricultura biológica e 54 a partir de produtos hortÍcolas de agricultura convencional (ver **Tabela 5**).

Tabela 5 – Número de isolados obtidos dos géneros bacterianos em estudo.

	Produtos hortÍcolas	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Produtos hortÍcolas de agricultura biológica	Brócolos	2	8
	Cenoura	3	*
	Couve coração	*	8
	Couve portuguesa	8	7
	Espinafres	6	9
	Pimento verde	*	6
	Tomate	*	3
	Total= 7	Total= 19	Total= 41
Produtos hortÍcolas de agricultura convencional	Brócolos	7	7
	Cenoura	6	5
	Couve coração	*	9
	Couve portuguesa	4	9
	Espinafres	7	9
	Pimento verde	1	6
	Tomate	*	9
	Total= 7	Total= 25	Total= 54

Legenda * Não foi recolhido nenhum isolado do respetivo produto.

4.2 Identificação molecular ao nível do género dos isolados em estudo

Para identificação de microrganismos patogénicos presentes em alimentos podem ser utilizados tanto métodos convencionais como métodos moleculares (Venkataiah *et al.*, 2013). Assim, para confirmação da identificação dos 44 isolados de *Aeromonas*, recorreu-se à técnica PCR para ampliação dos genes *gcat* e rRNA 16S (Chacón *et al.*, 2002; Marques, 2011). Foi possível confirmar a identificação de 26 isolados como pertencentes ao género *Aeromonas* spp., dos quais 13 correspondem a isolados obtidos a partir de produtos hortícolas de origem biológica, e 13 de produtos hortícolas de origem convencional (ver **Tabela 6**). Estes resultados sugerem que o género *Aeromonas* spp. pode estar presente em diversos tipos de produtos hortícolas, tal como demonstrado por estudos anteriores (Das *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013).

Para confirmação da identificação presuntiva dos 95 isolados de *Enterococcus* spp. recorreu-se à técnica de PCR para determinar a presença do gene *tuf*, tal como descrito por Ke *et al.*, 1999. Dos 95 isolados avaliados foi possível confirmar que 78 pertenciam ao género *Enterococcus* spp., dos quais 34 foram obtidos a partir de produtos hortícolas de origem biológica e 44 a partir de produtos hortícolas de origem convencional (ver **Tabela 6**). Estes resultados demonstraram que o género *Enterococcus* spp. pode estar presente em diferentes tipos de produtos hortícolas, tal como relatado em estudos anteriores (Camargo *et al.*, 2014; Johnston e Jaykus, 2004; McGowan *et al.*, 2006; Said *et al.*, 2015; Trivedi *et al.*, 2011).

Tabela 6 – Número de isolados identificados dos géneros bacterianos em estudo, após confirmação por métodos moleculares.

	Produtos hortícolas	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Produtos hortícolas de agricultura biológica	Brócolos	2	6
	Cenoura	1	*
	Couve coração	*	8
	Couve portuguesa	6	7
	Espinafres	4	7
	Pimento verde	*	3
	Tomate	*	3
	Total= 7	Total= 13	Total= 34
Produtos hortícolas de agricultura convencional	Brócolos	5	5
	Cenoura	3	5
	Couve coração	*	8
	Couve portuguesa	1	7
	Espinafres	4	7
	Pimento verde	0	4
	Tomate	*	8
	Total= 7	Total= 13	Total= 44

Legenda: * Não foi recolhido nenhum isolado do respetivo produto

Analisando os resultados obtidos (**Tabela 6**), no geral verificou-se, que no caso das aeromonas, foram obtidos exatamente o mesmo número total de isolados nos produtos mencionados. Quando estes produtos hortícolas são consumidos crus ou insuficientemente processados, podem ser uma fonte desses microrganismos e assim causar intoxicações alimentares em humanos, sendo necessário ter em consideração que os alimentos contaminados por aeromonas podem ser ingeridos por crianças e indivíduos imunocomprometidos, cujas defesas são menos eficazes.

Outro dos aspetos a ter em atenção é a fase de recolha e manutenção dos produtos hortícolas, pois podem criar condições propícias para multiplicação de aeromonas, incluindo a temperatura, o método de processamento, o nível de contaminação inicial e todo o processo de transporte até à preparação/consumo dos produtos. Convém ainda frisar que a água é um importante disseminador de *Aeromonas* spp. e o seu uso é indispensável para o processamento de inúmeros géneros alimentícios, assim torna-se essencial fazer o devido tratamento da água para que se possa diminuir o risco de doenças transmitidas por géneros alimentícios causadas por aeromonas (McMahon e Wilson, 2001; Neysts *et al.*, 2000; Stratev e Odeyemi, 2015; Tavares *et al.*, 2014).

No geral, verificou-se que no caso dos enterococos foi obtido um maior número de isolados totais nos produtos hortícolas de agricultura convencional do que dos produtos hortícolas de agricultura biológica. Há alguns fatores que podem ter contribuído para estes resultados, incluindo as condições propícias à sua multiplicação (temperatura, pH e humidade), a manipulação dos produtos durante o processamento. Sendo que um dos aspetos em ter em consideração é o facto de este microrganismo ser considerado um indicador de contaminação fecal (Moses e Oluwaniyi, 2015; Varela *et al.*, 2013).

Um das questões que é preciso ter em atenção são as práticas de cada um dos tipos de agricultura, sendo numerosas as fontes que podem estar implicadas na contaminação de produtos hortícolas colhidos a partir de quintas ou adquiridos em supermercados (Said *et al.*, 2015).

Os produtos hortícolas de agricultura biológica, provenientes de quintas, são diretamente colhidos, enquanto no caso dos produtos de agricultura convencional, disponíveis nas unidades comerciais, ainda demoram algum tempo a chegar às mãos do consumidor e são manipulados durante este período, tudo isto contribui para a multiplicação, manutenção e disseminação de microrganismos (Schwaiger *et al.*, 2011). Um outro aspeto que é bastante importante é o facto de os enterococos serem considerados indicadores de contaminação fecal, o que pode ser problemático, pois isso significa que podem ser encontrados em fezes humanas/animais e em solos, estando em contacto direto com os produtos hortícolas (Boehm e Sassoubre, 2014).

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo observou-se que os produtos hortícolas de agricultura biológica e convencional possuíam mais enterococos do que aeromonas. No entanto, é necessários fazer mais estudos acerca do porquê do desenvolvimento destes microrganismos em produtos hortícolas, fazendo por exemplo uma avaliação da composição do solo, do tipo de água utilizada e ter em atenção a cadeia de processamento do produto em causa (Dos Santos, 2001). Sendo necessário apurar o cumprimento/incumprimento das normas de controlo de qualidade, uma vez que a contaminação de produtos hortícolas para consumo por microrganismos patogénicos, poderá ter implicações graves ao nível da saúde pública, principalmente ao nível das intoxicações alimentares

4.3 Avaliação da diversidade

Existindo a possibilidade de os isolados selecionados serem clones, uma vez que de cada placa de isolamento foram recolhidas várias colónias, o objetivo seguinte foi eliminá-los e selecionar os representantes da diversidade presente nas amostras em estudo.

Procedeu-se então à avaliação da diversidade dos 26 isolados de *Aeromonas* spp. por aplicação da técnica de PCR-fingerprinting, recorrendo a dois *primers*, M13 e 1281, dirigidos para regiões aleatórias do genoma bacteriano (em reações independentes). No entanto, após análise visual dos géis de electroforese observou-se que os perfis obtidos com o *primer* M13 eram demasiado fracos e indefinidos (resultados não mostrados). Assim, optou-se por prosseguir o estudo apenas com os dados obtidos com o *primer* 1281.

De seguida os géis de *PCR-fingerprinting* foram analisados utilizando o *software* *Bionumerics*®. Começámos por determinar a reprodutibilidade da técnica após análise de 10 % de réplicas, para tal analisámos o nível de semelhança entre o perfil obtido com o *primer* 1281 para cada um dos isolados do género *Aeromonas* e o perfil correspondente, obtido para a sua réplica. O dendrograma que resultou desta comparação permitiu identificar o nível de 80 % como correspondendo à reprodutibilidade desta metodologia (linha a tracejado na **Figura 4**), como tal todos os isolados agrupando a nível de semelhança superiores a 80 % foram considerados idênticos, ou muito semelhantes. Esta abordagem permitiu selecionar os isolados genomicamente distintos, presentes em cada um dos produtos em análise, resultando um total de 20 representantes para as análises posteriores, 10 recolhidos de produtos de agricultura biológica e 10 pertencentes aos isolados de agricultura convencional (assinalados na **Figura 4**).

Para os *Enterococcus* spp., o método de análise foi similar ao anteriormente citado, tendo-se obtido um nível de reprodutibilidade de 76%. De seguida, para avaliar a diversidade microbiana da população em estudo, foi construído um dendrograma com base nos perfis de *PCR-fingerprinting* de todos os isolados, considerando os perfis obtidos para os dois *primers* utilizados (ver **Figura 5**). A linha de corte considerada para a definição de *clusters* correspondeu ao nível de reprodutibilidade da técnica 76%. Os grupos de isolados com níveis de semelhança iguais ou superiores a 76% foram considerados iguais ou extremamente semelhantes, ficando com um total de 54 representantes, 22 pertencentes aos isolados de agricultura biológica e 32 pertencentes aos isolados de agricultura convencional.

Pela análise dos dendrogramas foi ainda possível observar níveis elevados de semelhança entre isolados de produtos hortícola de origem biológica e convencional, tanto para o género *Aeromonas* como para o género *Enterococcus*.

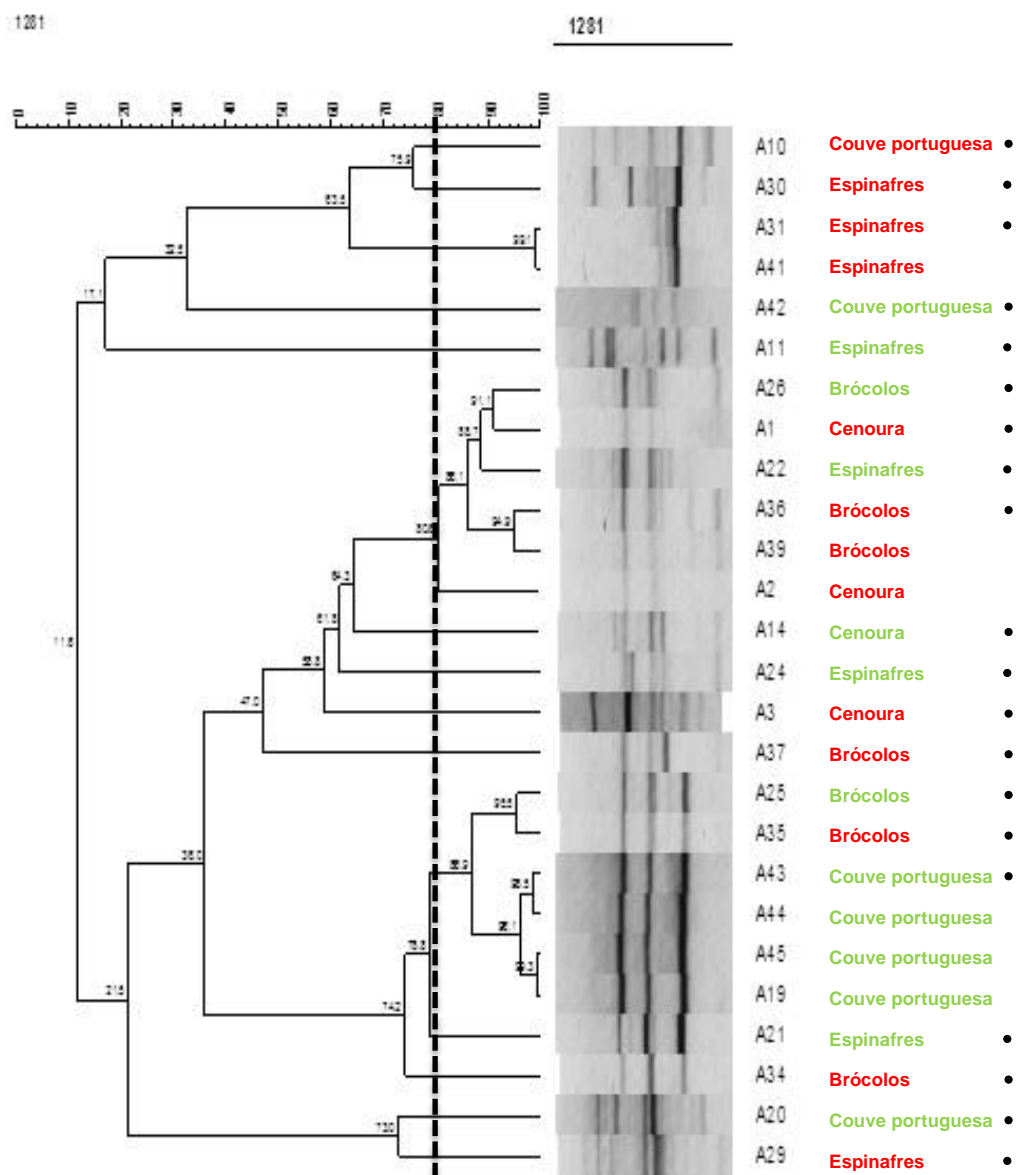


Figura 4 -Dendrograma obtido com base nos perfis de *PCR – fingerprinting* do *primer* 1281 de todos os isolados de origem biológica e convencional referente ao género *Aeromonas* agrupados através do coeficiente de Pearson e do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). A linha preta a tracejado corresponde simultaneamente à linha de reprodutibilidade/linha de corte que permitiu a seleção de representante.

Legenda: vermelho- isolados de origem convencional; verde- isolados de origem biológica; • representantes dos isolados selecionados para posterior análise.

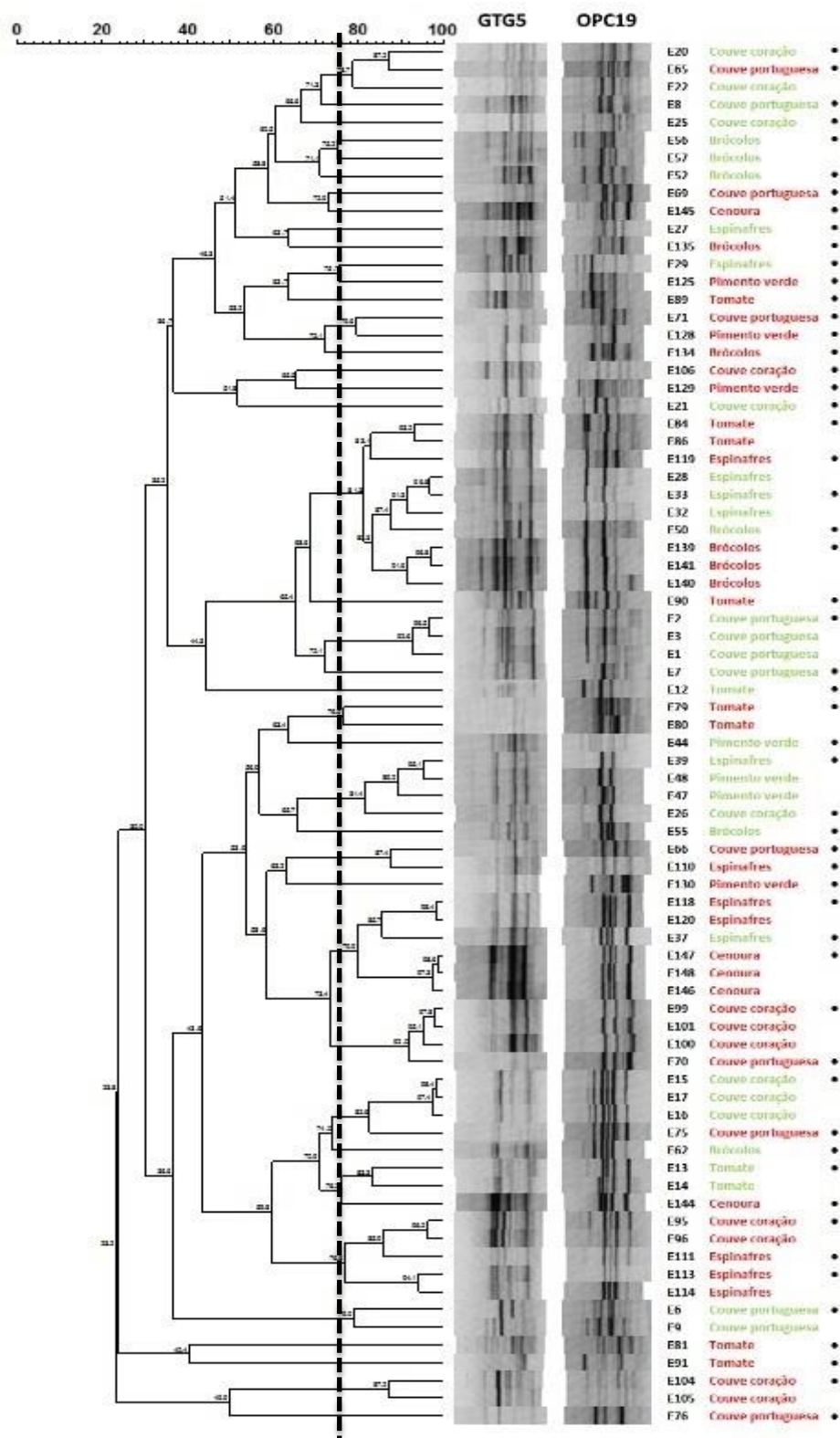


Figura 5 - Dendrograma obtido com base nos perfis de *PCR – fingerprinting* dos primers (GTG)₅ e OPC19 de todos os isolados de origem biológica e convencional referentes ao género *Enterococcus* agrupados através do coeficiente de Pearson e do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). A linha preta a tracejado corresponde simultaneamente à linha de reprodutibilidade/linha de corte que permitiu a seleção de representante.

Legenda: vermelho-isolados de origem convencional; verde- isolados de origem biológica; • representantes dos isolados selecionados para posteriores análises.

4.4 Avaliação da suscetibilidade dos isolados a agentes antimicrobianos

Atendendo a que muitos produtos hortícolas são consumidos crus, há um elevado risco de contaminação com microrganismos potencialmente patogénicos, podendo favorecer o desenvolvimento de infeções gastrointestinais (Abriouel *et al.*, 2008; Schwaiger *et al.*, 2011). É então importante avaliar a sua suscetibilidade dos microrganismos isolados a diferentes agentes antimicrobianos.

4.4.1 *Aeromonas* spp.

Estão representados na **Tabela 7** os isolados resistentes aos agentes antimicrobianos testados. A distribuição relativa dos agentes antimicrobianos (%) não é apresentada devido ao número reduzido dos isolados em estudo.

Tabela 7 – Número de isolados resistentes em *Aeromonas* spp.

Agentes antimicrobianos	Produtos hortícolas		
	Biológicos (n= 10)	Convencionais (n= 10)	Total (n= 20)
Amoxicilina-Ácido Clavulânico (AMC)	8	8	16
Cefotaxima (CTX)	3	4	7
Ceftazidima (CAZ)	3	1	4
Ertapenem (ETP)	3	6	9
Imipenem (IPM)	1	1	2
Aztreonam (ATM)	2	5	7
Amicacina (AK)	0	3	3
Gentamicina (CN)	1	2	3
Tetraciclina (TE)	0	0	0
Cloranfenicol (C)	1	0	1
Ácido Nalidíxico (NA)	1	2	3
Ciprofloxacina (CIP)	0	1	1
Levofloxacina (LEV)	0	0	0
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	2	2	4

Apesar de não ser muito frequente haver resistência a diferentes agentes antimicrobianos em isolados de produtos hortícolas (Palú *et al.*, 2006), no presente estudo observaram-se alguns casos de

resistência cruzada. Assim, na **Tabela 7** o antimicrobiano que se destacou mais em termos de resistência foi a AMC, para o qual existe um grande número de isolados resistentes nos produtos hortícolas analisados neste estudo, que nos sugere que terá uma atividade pouco eficaz contra estes isolados. De seguida o antimicrobiano para o qual os isolados mostraram elevada resistência foi o ETP.

No presente estudo, houve ainda isolados resistentes ao antibiótico NA em ambos os tipos de produtos hortícolas, cuja presença se pode explicar através do estudo de Alcaide *et al.*, (2010), que nos diz que antibióticos da classe das quinolonas persistem por um longo período no ambiente, favorecendo a emergência de resistência em amostras ambientais.

No caso do antibiótico TE não foi obtido qualquer isolado resistente, enquanto que para o C observou-se apenas um isolado de cada um dos grupos de produtos hortícolas de agricultura biológico que apresentou resistência. Estes níveis reduzidos de resistência a estes agentes já tinham sido relatados pelo estudo de Awan *et al.* (2009), estando cada vez mais descrito que estes antibióticos têm uma excelente actividade *in vitro* contra as aeromonas. A resistência a estes antibióticos tem sido descrita como sendo adquirida e codificada por plasmídeos e transposões (Palú *et al.*, 2006).

Os resultados relativamente ao antibiótico CIP, mostrados na **Tabela 7**, revelam que houve apenas um isolado resistente nos grupos de produtos hortícolas de agricultura convencional em estudo, resultado que contrasta com o estudo de Awan *et al.* (2009), na qual se registou a suscetibilidade de todos os isolados testados a este antibiótico.

Relativamente ao SXT verificou-se em ambos os grupos hortícolas a existência de dois isolados resistentes.

O desenvolvimento de bactérias pertencentes ao género *Aeromonas* em géneros alimentícios pode causar problemas ao nível da saúde pública (Stratev e Odeyemi, 2015). Os níveis de resistência a antibióticos observados no presente estudo devem constituir uma chamada de atenção, uma vez que o consumo de produtos hortícolas crus tem vindo a aumentar, tal como mencionado por Adebayo *et al.* (2012). Sendo que a presença de resistência a antibióticos pode levar a uma maior dificuldade no tratamento dessas doenças de origem alimentar.

A suscetibilidade a agentes antimicrobianos de aeromonas de diferentes origens tem sido alvo de vários estudos (Awan *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2012, Das *et al.*, 2013; Stratev e Odeyemi, 2015). Um dos fatores que parece ter influência no aparecimento de resistências a antibióticos é a água, uma vez que esta pode estar contaminada por resíduos de antibióticos. Isto apesar de se notar que as amostras clínicas são mais propícias a apresentarem resistência, devido ao ambiente ainda mais seletivo a que estes microrganismos estão sujeitos, tal como descrito por Aravena-Román *et al* (2011).

Para verificar se existia relação entre a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos testados de isolados de *Aeromonas* obtidos de diferentes tipos de produção de hortícolas, realizou-se o teste do Fisher. Não foi possível realizar o teste do qui-quadrado porque foi observado que um número superior a 20 % das células continha uma frequência esperada inferior a cinco e pelo facto de o número de isolados ser reduzido (n=20). Assim, foi obtido um valor de $p\text{-value} > 0,05$, o que significa que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o desenvolvimento da resistência nos grupos de isolados provenientes de produtos hortícolas biológicos e convencionais.

Tabela 8 - Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo.

Agentes antimicrobianos			Produtos hortícolas			
			Biológicos (n= 10)	Convencionais (n= 10)		
Classes	Alvos Celulares	Símbolo	A 22	A 37	A 10	A 30
β-Lactâmicos	Inibem a síntese do peptidoglicano	AMC	✓	✓	✓	✓
		CTX		✓	✓	✓
		CAZ		✓		
		ETP		✓	✓	✓
		ATM		✓	✓	✓
Aminoglicosídeos	Inibem a síntese das proteínas	AK				✓
		CN	✓			✓
Quinolonas	Inibem a síntese dos ácidos nucleicos	NA		✓	✓	
Fluoroquinolonas		CIP		✓		
Inibidores da via fosfatos		SXT	✓	✓	✓	

Legenda: AMC – Amoxicilina-Ácido Clavulânico; CTX- Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; ETP – Ertapenem; ATM – Aztreonam; AK – ampicilina; CN – Gentamicina; C – Cloranfenicol; NA – Ácido Nalidíxico; CIP – Ciprofloxacina; SXT – Trimetoprim-Sulfametoxazol

A 22 – isolado de espinafre, A 37 – isolado de brócolo; A 10 – isolado de couve portuguesa e A 30 – isolado de espinafre.

✓ - Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo

De acordo com a definição de Magiorakos *et al.* (2011), são consideradas multirresistentes as bactérias que apresentam resistência *in vitro* a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes diferentes, com alvos diferentes na célula.

Podemos então verificar-se através da observação da **Tabela 8**, que um isolado obtido de espinafres de agricultura biológica, apresentou multirresistência. No caso dos produtos hortícolas convencionais existiram três isolados que apresentaram multirresistência, obtidos de diferentes produtos: brócolos, couve portuguesa e espinafres.

No caso do isolado A 22, este foi resistente a três antibióticos de três classes diferentes com alvos distintos. No caso do isolado A 37, este foi resistente a oito antibióticos diferentes, de quatro classes diferentes, com alvos distintos. O isolado A 10 foi resistente a seis antibióticos de três classes de antibióticos com alvos distintos e o isolado A 30 foi resistente a seis antibióticos diferentes de três classes de antibióticos com alvos distintos.

Estes resultados podem sugerir que é preciso aprofundar o estudo e apurar a razão para esta ocorrência, e também que é bastante importante saber qual a origem das resistências a antibióticos apresentadas por estas bactérias, porque é relevante para a saúde pública (Igbinosa *et al.*, 2012).

4.4.2 *Enterococcus* spp.

Estão representados na **Tabela 9** os isolados resistentes aos agentes antimicrobianos testados. A distribuição relativa dos agentes antimicrobianos (%) não é apresentada devido ao número reduzido dos isolados em estudo.

Tabela 9 – Número de isolados resistentes em *Enterococcus* spp.

Agentes antimicrobianos	Produtos hortícolas		
	Biológicos	Convencionais	Total
	(n= 22)	(n= 32)	(n= 54)
Amoxicilina – Ácido Clavulânico (AMC)	0	0	0
Ampicilina (AMP)	1	0	1
Penicilina G (P)	1	1	2
Vancomicina (VA)	0	0	0
Teicoplanina (TEC)	2	0	2
Bacitracina (B)	6	2	8
Estreptomicina (S)	0	0	0
Gentamicina (CN)	0	0	0
Tetraciclina (TE)	4	5	9
Linezolida (LZD)	0	0	0
Cloranfenicol (C)	0	0	0
Eritromicina (E)	1	1	2
Quinupristina-Dalfopristina (QD)	13	8	21
Ciprofloxacina (CIP)	0	0	0
Levofloxacina (LEV)	0	1	1

No geral os isolados dos produtos hortícolas de ambas as agriculturas mostraram ser resistentes a diversos agentes antimicrobianos testados, sendo que os mais que se destacam são: B, TE e QD (ver

Tabela 9).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes à maioria dos antibióticos mais utilizados, incluindo as cefalosporinas e aminoglicosídeos (Burgos *et al.*, 2014; Oryaşın *et al.*, 2013) no entanto, no presente estudo nenhum isolados mostraram ser resistentes a antibióticos da classe aminoglicosídeos nomeadamente a CN.

Todos os isolados no presente estudo mostraram ao antibiótico AMC suscetibilidade, e um número baixo de isolados mostrou resistência à P e à AMP, pertencentes à classe dos β -lactâmicos (**Tabela 9**), tal como descrito pelo estudo de Pesavento *et al.* (2014). A resistência à P leva a que esta não possa ser usada para o tratamento de infeções em enterococos. Um estudo prévio realizado por Johnston e Jaykus (2004) evidenciou sete isolados resistentes, provenientes de vários produtos hortícolas, entre eles: couve, espinafres, salsa. No caso do antibiótico AMP verificou-se que no estudo de Oryaşın *et al.* (2013) de entre todos os isolados, incluindo clínicos e ambientais (produtos hortícolas, frutas, entre outros), cinco isolados apresentaram resistência a este antibiótico, o que este autor considerou um valor baixo.

No caso do antibiótico AMC o facto de nos resultados do presente estudo os isolados mostrarem suscetibilidade é um aspeto positivo, e está de acordo com o estudo de Pesavento *et al.* (2014) onde se verificou que isolados de saladas prontas a consumir eram também susceptíveis a este antibiótico. Este facto pode sugerir que os resultados do presente estudo não são alarmantes em termos da presença de resistências em géneros alimentícios, pois este antibiótico é o mais eficaz em termos das infeções dos enterococos na clínica (Pesavento *et al.*, 2014).

No presente estudo os isolados demonstraram ser resistentes a antibióticos da classe dos glicopéptidos, como é o caso da TEC, para qual um pequeno número de isolados foi resistente, enquanto nenhum dos isolados mostrou ser resistente ao antibiótico VA, também pertencente a essa classe. Nos enterococos a resistência à classe dos glicopéptidos pode estar associada a produtos hortícolas frescos (Torre *et al.*, 2010). Contudo no caso do antibiótico VA verificou-se que os isolados mostraram ser susceptíveis, ou intermédios, o que está de acordo com o estudo de Oryaşın *et al.* (2013), que nos mostrou que os isolados clínicos e ambientais (produtos hortícolas e frutas), entre outros, mostraram ser susceptíveis a este antibiótico, e com o que está descrito no estudo de Pesavento *et al.* (2014), que encontrou apenas um isolado resistente. Em geral, e segundo o estudo de Johnston e Jaykus (2004), os isolados de produtos hortícolas normalmente são suscetíveis a este antibiótico, o que sugere que os produtos hortícolas não contribuem de forma significativa para a disseminação da resistência à VA.

Conforme apresentado na **Tabela 9**, nenhum isolado apresentou resistência à CN, tal como descrito pelo estudo de Oryaşın *et al.* (2013) que descreveu que todos os isolados da clínica e ambientais (produtos hortícolas e frutas, entre outros) mostraram suscetibilidade, e tal resultado poderá justificar-se pelo facto de haver uma ausência da pressão seletiva para a resistência a este antibiótico no ambiente.

Observou-se no presente estudo um elevado número de isolados, nos dois grupos de produtos hortícolas, resistentes ao antibiótico TE. Uma possível explicação para este resultado foi referida no estudo de McGowan *et al.* (2006), que sugeriu que este tipo de antibiótico pode ser usado como um promotor de multiplicação na produção animal.

Embora a QD seja recomendada para tratamento de infecções por enterococos, se observarmos a presença de isolados resistentes (tal como detectado no presente estudo) deverá optar-se por outros agentes antimicrobianos (Johnston e Jaykus, 2004).

A emergência da resistência a antibióticos em isolados de produtos hortícolas pode ser explicada pelo uso intensivo destes compostos em animais e em humanos e também no campo da agricultura, o que pode contribuir para a seleção e disseminação da resistência em enterococos de diferentes ecossistemas e à contaminação de alimentos, com implicações para a saúde pública (Said *et al.*, 2015).

Na maioria dos casos os produtos hortícolas são consumidos crus, o que pode implicar que são possíveis vetores na transmissão de resistência a antibióticos para o trato gastrointestinal humano/animal. Muitas vezes o aparecimento destas resistências em isolados de produtos hortícolas deve-se ao facto de estrume ser espalhado em campos agrícolas, e bactérias resistentes serem transferidas para essa área, tornando-se num ambiente propício para a transferência horizontal de genes de resistência às bactérias indígenas do solo. Este tipo de fonte de contaminação pode explicar as diferenças entre as resistências observadas nos resultados deste trabalho, tal como descrito por Torre *et al.* (2010).

Para verificar se havia alguma relação entre a origem dos isolados de *Enterococcus* (biológicos *versus* convencionais) e a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos testados aplicou-se o teste do qui-quadrado a um nível de significância estatística de 5 %. Nalguns casos foi utilizado o teste de Fisher, pois verificou-se que existiam mais de 20 % de células com frequência esperada inferior a cinco. (Terkuran *et al.*, 2014). Foi obtido um valor de *p-value* <0,05, o que significa que existem diferenças estatisticamente significativas entre os isolados de produtos de origem biológica e convencional para a resistência ao agente antimicrobiano QD (*p-value*= 0,035).

Tabela 10 – Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo.

Agentes antimicrobianos			Produtos hortícolas		
			Biológicos (n= 22)		Convencionais (n= 32)
Classes	Alvos Celulares	Símbolo	E 52	E 33	E 91
β Lactâmicos	Inibem a síntese do peptidoglicano	P			✓
Glicopéptidos		TEC		✓	
Polipéptidos		B	✓		✓
Estreptograminas	Inibem a síntese das proteínas	QD	✓	✓	✓
Macrólidos		E			✓
Tetraciclina		TE	✓	✓	
Fluoroquinolonas	Inibe a síntese dos ácidos nucleicos	LEV			✓

Legenda: P- Penicilina G, TEC – Teicoplanina; B – Bacitracina; QD-Quinupristina-Dalfopristina; E – Eritromicina; TE – Tetraciclina; LEV – Levofloxacina.

E 52 – isolado de brócolos; E 33- isolado de espinafres e E 91- isolado de tomate.

✓ - Multirresistência nos isolados de produtos hortícolas em estudo

Usando a definição de multirresistência (Magiorakos *et al.*, 2011) referida anteriormente pode-se verificar, através da observação da **Tabela 10**, que dois isolados pertencentes aos produtos hortícolas de agricultura biológica apresentaram multirresistência. No caso dos produtos hortícolas de agricultura convencional apenas um isolado foi multirresistente.

No caso do isolado E 52, este foi resistente a três antibióticos diferentes de três classes diferentes com alvos distintos; o isolado E 33 foi resistente a três antibióticos diferentes de três classes com alvos distintos. Por fim o isolado E 91 foi resistente a cinco antibióticos diferentes de cinco classes com alvos distintos.

É necessário haver um estudo mais aprofundado acerca destes géneros alimentícios e compreender de onde vem a multirresistência aos antibióticos testados.

4.5 Fatores de virulência

A presença de fatores de virulência como DNase, gelatinase e lipase em bactérias isoladas de produtos hortícolas pode significar um risco para a saúde do consumidor (Stratev *et al.*, 2012).

4.5.1 Fatores de virulência em *Aeromonas* spp.

Estão representados na **Tabela 11** os isolados positivos para a produção de fatores de virulência. A distribuição relativa dos fatores de virulência (%) não é apresentada devido ao número reduzido dos isolados em estudo.

Tabela 11 – Isolados produtores de fatores de virulência em *Aeromonas* spp.

Fatores de Virulência	Produtos hortícolas		
	Biológicos (n= 10)	Convencionais (n= 10)	Total (n= 20)
β Hemolisina	2	2	4
DNase	10	9	19
Gelatinase	3	2	5
Lipase	10	9	19

De acordo com a **Tabela 11**, verificou-se que os isolados de aeromonas provenientes de produtos hortícolas de agricultura biológica e convencional em geral produziram fatores de virulência. Sabe-se que a presença destes fatores de virulência é importante para o estabelecimento de infeções, tais como as gastroenterites (Janda e Abbott, 2010).

Através dos resultados obtidos podemos observar que houve uma diferença no número de isolados positivos para a produção dos fatores de virulência entre os dois tipos de produtos hortícolas analisados.

Pela observação dos resultados da produção de hemolisina, verificou-se que foi obtido um número muito reduzido de isolados positivos, o que neste caso pode ser um aspeto positivo, ou seja, os isolados não tem muita eficácia para produzir este fator de virulência, indicando uma baixa patogenicidade *in vitro*. O estudo de Monge *et al.*, 1998 indica que *Aeromonas* representam um risco para a saúde pública, sendo que muitos investigadores relacionaram a toxigenicidade de aeromonas com a produção de hemolisinas.

Comparando com o estudo de Callister e Agger (1987), em que isolados de vários tipos de produtos incluindo espinafres, salsa e brócolos apresentaram 27 isolados positivos para a hemolisina, o que significa que é um número maior de isolados positivos comparativamente com o presente estudo. Ainda no estudo de Martins *et al.* (2002) isolados a partir de vários géneros alimentícios, incluindo produtos hortícolas, apresentaram 17 isolados positivos para a hemolisina, isto é, apresentou maior número de isolados positivos em relação ao presente estudo. Quando comparamos amostras clínicas com ambientais verificou-se que existe maior prevalência de hemolisina em amostras clínicas do que em ambientais, tudo isto porque as amostras clínicas expressam ou têm presentes o perfil de virulência mais do que em géneros alimentícios. No estudo de Nishikawa *et al.* (1988), que detetou 11 isolados positivos a hemolisina, e que apesar de nos indicar que este fator de virulência é considerado o mais importante de todos referiu que existem outros determinantes de virulência igualmente relevantes para o processo infeccioso.

No caso da produção de DNase verificou-se um número semelhante de isolados positivos em ambos os tipos de produtos hortícolas de agricultura biológica e convencional. Este fenótipo pode contribuir para a patogenicidade da infeção, mas também aumenta a sua capacidade enzimática, que é essencial para a colonização de diferentes nichos ecológicos (Das *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Palumbo *et al.*, 1989). No estudo de Das *et al.* (2013) na qual foram obtidos 97% e 15% de isolados capazes de produzir este fator de virulência.

Quanto à produção de gelatinase verificou-se um número de isolados positivos mais reduzido, o que pode significar que foi possível que estes não conseguissem produzir suficientemente bem este fator de virulência. Isto pode contribuir para o não desenvolvimento da doença. O mesmo não se verificou no estudo de Das *et al.* (2013), no qual foi observado uma percentagem entre 54% e 58% de isolados positivos para a produção deste fator de virulência em vários produtos hortícolas.

No caso da produção da lipase verificou-se exatamente o mesmo número de isolados positivos que o obtido para a produção de DNase, tal como descrito no estudo de Das *et al.* (2013), no qual foram obtidos 95% e 24% de isolados capazes de produzir este fator.

Em resumo, estes resultados podem sugerir a presença de aeromonas patogénicas presentes em géneros alimentícios, nomeadamente produtos hortícolas.

Fatores de virulência como enterotoxinas, proteases, fosfolipases e hemolisinas podem causar danos nas células hospedeiras levando mesmo à sua destruição. Contudo um dos parâmetros importante que levam à expressão de fatores de virulência é a temperatura do ambiente, ou seja, como a temperatura do corpo humano é aproximadamente 37°C, estirpes que produzem fatores de virulência a esta temperatura têm mais significado como microrganismos patogénicos para humanos (Igbinosa, 2012). Esta variedade de secreção de enzimas como lipases, proteases, hemolisinas e as nucleases podem contribuir significativamente para a distribuição e adaptação de aeromonas no meio ambiente (Pemberton *et al.*, 1997).

O estudo de Das *et al.* (2013) sugere que as infeções por aeromonas em géneros alimentícios devem ser tratadas com seriedade, pois podem levar a vários perigos para a saúde tanto em populações humanas como animais.

Para verificar se havia relação entre a origem dos isolados de *Aeromonas* e a produção de fatores de virulência foi utilizado o teste exato de Fisher pois foi observado que um número superior a 20 % das células continha uma frequência esperada inferior a cinco (Terkuran *et al.*, 2014). Não foi observada uma associação estatisticamente significativa ($p\text{-value} > 0,05$) pelo que se conclui que não há uma associação entre a presença dos fatores de virulência e a origem dos isolados (biológicos *versus* convencionais).

4.5.2 Fatores de virulência em *Enterococcus* spp.

Estão representados na **Tabela 12** os isolados positivos à produção de fatores de virulência. A distribuição relativa dos fatores de virulência (%) não é apresentada devido ao número reduzido dos isolados em estudo.

Tabela 12 – Isolados produtores de fatores de virulência em *Enterococcus* spp.

Fatores de Virulência	Produtos hortícolas		
	Biológicos (n= 22)	Convencionais (n= 32)	Total (n= 54)
β Hemolisina	9	13	22
DNase	0	0	0
Gelatinase	5	7	12
Lipase	2	2	4

O presente estudo demonstrou que existiu a produção de fatores de virulência e encontraram-se disponíveis estudos sobre a ocorrência de fatores de virulência em enterococos em várias origens tais, como água, alimentos e amostras clínicas (Camargo *et al.*, 2014). Sendo que este resultado é igualmente referido no estudo de (Terkuran *et al.*, 2014), o qual sugeriu que existem diferenças em termos da incidência dos fatores de virulência. No entanto o estudo de Burgos *et al.* (2014) confirma que a presença de fatores de virulência em produtos hortícolas é relativamente baixa em comparação com a clínica.

No presente estudo os resultados mostraram que a hemolisina foi o fator de virulência para o qual se obteve maior produção nos isolados de ambas as agriculturas, o que pode significar que tem de haver um maior controlo de segurança nos produtos hortícolas. Em contraste, um estudo de Abriouel *et al.* (2008) mostrou que os isolados de produtos hortícolas tiveram uma incidência de produção de hemolisina mais baixa.

No presente estudo verificou-se que nenhum dos isolados dos dois tipos de produtos produziu o fator de virulência DNase, o que pode significar que estes isolados não são propícios ao desenvolvimento de infeção, e assim são considerados resultados não alarmantes.

Neste estudo houve alguns isolados dos dois grupos de produtos hortícolas mencionados na **Tabela 12** que produziram gelatinase, mostrando que estes podem causar a degradação de alimentos, tal como descrito pelo estudo feito em produtos hortícolas e outros produtos por Camargo *et al.* (2014). Outra possível explicação que este estudo nos indicou que a produção de gelatinase está associada à virulência em modelos animais.

No caso da lipase verificou-se que nos dois tipos de produtos hortícolas de ambas as agriculturas se observou o mesmo número de isolados positivos, apesar de o número apresentado não ser muito significativo.

A produção de fatores de virulência por enterococos de géneros alimentícios não está muito bem compreendida, mas no estudo de Camargo *et al.* (2014) sugeriu que estirpes presentes no ambiente e em géneros alimentícios podem representar um reservatório natural para a resistência a antibióticos e para a produção de fatores de virulência.

Para verificar se havia alguma relação entre a origem dos isolados de *Enterococcus* (biológicos *versus* convencionais) e a produção de fatores de virulência testados aplicou-se o teste qui-quadrado a um

nível de significância estatística de 5 %. Nalguns casos foi utilizado o teste de Fisher, pois verificou-se que existiam mais de 20 % de células com frequência esperada inferior a cinco (Terkuran *et al.*, 2014). Contudo não existe uma associação estatisticamente significativa entre a produção dos fatores de virulência e os grupos de isolados provenientes de produtos hortícolas de origem biológica e convencional (*p-value* > 0,05).

5. Conclusões

Os produtos hortícolas são géneros alimentícios importantes na alimentação, sendo que se tem verificado um aumento no consumo destes produtos. Para além disso, os produtos hortícolas podem atuar como veículo de agentes potencialmente patogénicos, uma vez que são frequentemente consumidos crus ou insuficientemente processados.

O principal objetivo deste estudo, consistiu na pesquisa de microrganismos patogénicos pertencentes aos géneros *Aeromonas* e *Enterococcus* a partir de amostras de produtos hortícolas de origem biológica e convencional, tendo sido feita uma avaliação ao nível da patogenicidade incluindo a caracterização de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e a produção dos fatores de virulência.

A partir dos sete produtos hortícolas analisados, foi possível observar a presença de *Aeromonas* e *Enterococcus*, através de métodos fenotípicos e moleculares, para ambos os géneros, permitindo sugerir que estes géneros bacterianos estão presentes nos dois tipos de agriculturas representadas no estudo.

Através da avaliação da diversidade dos isolados de ambos os géneros bacterianos verificou-se que os isolados de agricultura biológica se agrupam com os isolados recolhidos das amostras de agricultura convencional.

O potencial de patogenicidade associado aos isolados foi avaliado analisando a suscetibilidade a diferentes antibióticos e verificando a produção de fatores de virulência como a hemolisina, DNase, gelatinase e lipase. Os resultados demonstraram a resistência de alguns isolados aos agentes antimicrobianos testados, assim como a produção de fatores de virulência.

Apesar de toda a problemática associada aos isolados presentes no estudo, não devemos esquecer que a maioria dos isolados de *Aeromonas* e *Enterococcus* foram obtidos através de amostras enriquecidas.

Os resultados obtidos podem não ser inquietantes em termos da saúde pública. Mas é importante haver um controlo destes géneros bacterianos em alimentos e superfícies de contato com os mesmos, de forma a ser possível avaliar a incidência de infeções associadas a ambos os géneros bacterianos e assim inferir qual o seu impacto real na população.

No final desta investigação, houve algumas questões em aberto que podem ser aprofundados em trabalhos futuros:

Será importante a continuação deste trabalho para a pesquisa de genes de resistência aos agentes antimicrobianos e genes de virulência, para complementar o estudo para ambos os géneros bacterianos.

Outra análise que se poderá fazer para ambos os géneros bacterianos é verificar a sua capacidade de produzirem biofilmes, sendo que estas comunidades de bactérias podem conferir proteção acrescida contra condições ambientais desfavoráveis, como a falta de nutrientes, stress oxidativo e mecanismos de

defesa do hospedeiro. Além disso, sabe-se que a matriz exopolissacarídica do biofilme impede ou dificulta a entrada de agentes antimicrobianos, favorecendo o aparecimento de resistência a antibióticos. O aparecimento de biofilmes, que pode ocorrer tanto em superfícies associadas aos equipamentos utilizados na indústria alimentar como ao ambiente hospitalar, podem ainda levar a contaminações cruzadas e/ou infecções em humanos.

6. Referências

- Abriouel H., Omar N. B., Molinos A. C., López R. L., Grande M. J., Martínez-Viedma P., Ortega E., Cañamero M. M., Galvez A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity e incidence of virulence factors e antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit e vegetable foods, water e soil, e clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 38–49.
- Adebayo E. A., Majolagbe O. N., Ola I. O. e Ogundiran M. A. (2012). Antibiotic resistance pattern of isolated bacterial from salads. *Journal of Research in Biology*, 2: 136–142.
- Alcaide E., Blasco M.-D., Esteve C. (2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*, 161: 40–45.
- Alves R. A. A., Sampaio F. C., Guedes O. A., Alencar A. H. A., Estrela C. R. A., Estrela C. (2012). Suscetibilidade do *E. faecalis* e *S. aureus* a vários antimicrobianos. *Revisão Odontológica do Brasil Central*, 21(56): 426–429.
- Aravena-Román M., Inglis T. J. J., Henderson B., Riley T. V., e Chang B. J. (2011). Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* Strains Isolated from Clinical e Environmental Sources to 26 Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents e Chemotherapy*, 1110–1112.
- Awan M. B., Maqbool A., Bari A., Krovacek K. (2009). Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiologica*, 32: 17–23.
- Aziz M. H. A., Diab A. F., Selim S. A., El-Alfay S. M., Mousa M. A. (2004). Distribution, involvement ana plasmid characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foodstuffs e human infections. *Egyptian Journal of Biology*, 6: 12–20.
- Barroco C. (2013). Antibiorresistência e pesquisa de fatores de virulência em *Aeromonas* spp. Dissertação apresentada ao Mestrado de Microbiologia Aplicada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Bellei B., Miguel M., Mer Del Aguila E. M., Silva J. T., e Poschoalin V. M. F. (2011). Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* e its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. *Journal of Microbiology e Antimicrobials*, 3 (5): 119–125.
- Boehm A. B., Sassoubre L. M. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. *Enterococci From Commensals to Leading Causes Drug Resistant Infection*, 1-17.
- Burgos M. J. G., Aguayo M. C. L., Pulido R. P., Gálvez A., López R. L. (2014). Multilocus sequence typing and antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolates from fresh produce. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105: 413–21.
- Camargo C. H., Bruder-Nascimento A., In Lee S. H., Júnior A. F., Kaneno R., Rall V. L. M. (2014). Prevalence e phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1): 111–115.
- Castelo-Branco D., Guedes G., Marcos F. R., Sidrim J., Moreira J., Cordeiro R., Sales J., Riello G., Alencar L., Araujo-Neto M., Vasconcelos D., Bezerra de Menezes I., Ponte Y., Sampaio C., Monteiro A., Bandeira T. (2015). Virulence e antimicrobial susceptibility of clinical e environmental strains of *Aeromonas* spp. from Northeastern Brazil. *Canada Journal of Microbiology*, 1–17.
- Castro-Escarpull i G., Figueras M. J., Aguilera-Arreola G., Soler L., Fernández-Rendón E., Aparicio G. O., Guarro J., Chacón M. R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 41–49.
- CBI M., Intelligence. (2015). CBI Trade Statistics : Fresh Fruit e Vegetables in Europe. 1–16.
- Callister S. M., e Agger W. A. (1987). Enumeration and Characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* Isolated from Grocery Store Produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2):249-253.

- Chacón M. R, Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J., Figueras M. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*. 44 (3): 221–225.
- Chopra A. K. (2008). Characterization of waterborne *Aeromonas* species for their virulence potential. *Project Sujaect Area High-Quality Water*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard dilution and disk susceptibility testing for infrequently isolated for fastidious bacteria: Proposed Guideline M45-A. (2006). CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard dilution and disk susceptibility testing for infrequently isolated for *Enterococcus* spp. : Proposed Guidelines M100-S13. (2013). CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard dilution and disk susceptibility testing for infrequently isolated for *Enterobacteriaceae*: Proposed Guidelines M100-S13. (2013). CLSI, Wayne, PA, USA.
- Das A., Sindhuja M. E., Rathore A., Karthikeyan M. (2013). Diagnosis of virulent strains of motile *Aeromonas* from commercial food. *International Journal of Current Microbiology and Applied of Sciences* 2 (11): 300–306.
- Das A., Vinayasree V., Santhosh C. R., e Hari S. S. (2012). Surveillance of *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* from commercial food stuffs e environmental sources. *Journal of Experimental Sciences* 3 (9): 36–42.
- Dhiraputra C., Tiensasitorn C., Techachaiwiwat W., Jirapanakorn N., Kachintorn K., Danchaivijitr S. (2005). Bacterial contamination of vegetables served in hospitals. *J. Med. Assoc. Thai*, 88 (10): S42–8.
- Dos Santos J. Q. (2001). Fertilização & Ambiente. Reciclagem Agro-Florestal de Resíduos e Efluentes. Publicações Europa-América. Coleção Euroagro.
- Epuru S., Eideh A., Al Bayoudh A. A., Alshammari E. (2014). Fruit and Vegetables Consumption Trends Among The Female University Students in Saudi Arabia. *European Scientific Journal*, 10 (12): 223–237.
- Erdem B., Karıptaş E., Çil E., Işık K. (2011). Biochemical identification e numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 35: 463–472.
- Euzéby J. P. [<http://www.bacterio.cict.fr/a/aeromonas.html>]. Último acesso a 23 de setembro de 2016].
- Euzéby J. P. [<http://www.bacterio.cict.fr/a/enterococcus.html>]. Último acesso a 23 de setembro de 2016].
- Fernández-Fuentes M. A., Abriouel H., Morente E. O., Pulido R. P., Gálvez A. (2014). Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. *International Journal of Food Microbiology*, 172: 49–56.
- Ghenghesh K. S, Ahmed S. F., El-Khalek R. A., Al-Gendy A., Klena J. (2008). *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Journal Infection of Developing Countries*, 2 (2): 81–98.
- Gomes B.C., Franco B. D. G. M., Pereira de Martinis E.C. (2010). Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology e Microbial Biotechnology*, 1119–1125.
- Gomes B. C., Esteves C. T., Palazzo I. C. V., Darini A. L. C., Felis G. E., Sechi L. A., Franco B. D. G. M., De Martinis E. C. P. (2008). Prevalence e characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Journal of Food Microbiology*, 25: 668–675.
- Hashem Y. A., Yassin A. S., Amin M. A. (2015). Molecular characterization of *Enterococcus* spp. clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian Journal of Medicinal Microbiology*, 33 (1): 80–86.
- Heaton J. C. e Jones K. (2008). Microbial contamination of fruit e vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 613–626.

- Hollenbeck B. L. e Rice L. B. (2012). Intrinsic e acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3 (5): 421–433.
- Hsueh P- R., Teng L- J., Lee L- N., Yang P.-C., Ho S- W., Luh K.-T. (1999). Dissemination of High-Level Penicillin-, Extended-Spectrum Cephalosporin-, and Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Clones in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1): 221–224.
- Igbinosa I. H., Igumbor E. U. , Aghdasi F., Tom M., Okoh A. I. (2012). Emerging *Aeromonas* Species Infections e Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*, 1–13.
- Instituto Nacional de Estatística. 2014. Estatísticas Agrícolas 2014:172.
- Iweriebor B. C., Gaqavu S., Obi L. C., Nwodo U. U, e Okoh A.I. (2015). Antibiotic Susceptibilities of *Enterococcus* Species Isolated from Hospital e Domestic Wastewater Effluents in Alice, Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research of Public Health*, 12: 4231–4246.
- Janda J. M., Abbott S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (5): 35–73.
- Johnston L. M. e Jaykus L-A. (2004). Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Produce. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (5): 3133–3137.
- Kaur P., Rai N. (2015). Bacteriological Analysis of Fresh Vegetables from Main Market of Dehradun. *International Journal of Pharmaceutical Technological Research*, 8(3): 415–425.
- Ke D., Picard F. J, Martineau F. , Ménard C. , Roy P. H., Ouellette M., e Bergeron M. G. (1999). Development of a PCR assay for Rapid Detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11): 3497–3503.
- Lebreton F., Willems R. J. L., Gilmore M. S. (2014). *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, e Gut Colonization. *Enterococci From Commensals to Leading Causes Drug Resistant Infection*.
- Lei M., Dai X. e Liu M. (2014). Stress Effects on Virulence-related Genes Expression in *Enterococcus faecalis* from Food Source. *Advance Journal of Food Science adn Technology*, 6 (4): 547–551.
- Lopes M. F. S., Simões A. P., Tenreiro R., Marques J. J. F., Crespo M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 112 (3): 208–214.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. (2010). Brock Biology of Microorganisms 13th edition. Benjamin Cummings.
- Magiorakos A-P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulus A., Weber J.T., Monnet D.L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pondrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *European Society of Clinical Microbiology e Infectious Diseases*, 18: 268–281.
- Marques C. L. M. (2011). Identificação molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isolados durante um surto de diarreia em São Bento do Uno.PE. Dissertação Apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz.
- Martins L. M., Marquez R. F., Yano T. (2002). Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, 32: 237-242.
- McGowan L. L., Jackson C. R. , Barrett J. B., Hiott L. M. , Fedorka-Cray P. J. (2006). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Fruits, Vegetables, and Meats. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2976–2982.
- McMahon M. A. S., Wilson I. G. (2001). The occurrence of enteric pathogens e *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 155–162.

Microbiologia alimentar - regras gerais para análise microbiológicas - NP2079 (1989).

- Mohammed H. Q., Al-Samarrai K. W., Jasim H. M. (2013). Detection of virulence factors produced by local isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3 (6): 172–181.
- Monge R., Arias-Echandi M. L., Utzinger D. (1998). Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. *Revisão Biomédica*, 9: 176–180.
- Moreira P. A., Padrão P. D. (2004). Educational e economic determinants of food intake in portuguese adults: a cross-sectional survey. *BioMed Central Public Health* 4 (58): 1-11.
- Moses D. O., T. Oluwaniyi. (2015). Assessment of the Microbiological Effectiveness of Five Sanitizers in Reducing the Population of *Enterococcus faecalis* Isolated from Salad Vegetables- Sanitation and Hygiene Improvement Study. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5 (7): 542–550.
- Neyts K., Huys G., Uyttendaele M., Swings J. e Debevere J. (2000). Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Applied Microbiology*, 31: 359–363.
- Nishikawa Y., Kishi T. (1988). Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiology and Infection*, 101: 213-223.
- Odeyemi O. A., Ahmad A. (2013). Anti-biogram e resistogram profiling of *Aeromonas* species isolated from Malaysian aquatic sources. *Journal Coastal Life Medicine*, 1(2): 108–112.
- Odeyemi O. A., Ahmad A. (2015). Antibiotic resistance profiling and phenotypic typing of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1-6.
- Oryaşın E., Biyik H.H., BAŞBÜLBÜL G., BOZDOĞAN B. (2013). Antimicrobial susceptibility patterns of environmental and hospital isolations of enterococci in Aydn. *Turkish Journal of Biology*, 37: 514–519.
- Pablos M., Huys G., Cnockaert M., Rodríguez-Calleja J. M., Otero A., Santos J. A., García-López M. L. (2011). Identification e epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 203–210.
- Palú A. P., Gomes L. M., Miguel M. A. L., Balassiano I. T., Queiroz M. L. P., Freitas-Almeida, A. C., De Oliveira S. S. (2006). Antimicrobial resistance in food e clinical *Aeromonas* isolates. *Journal of Food Microbiology*, 23: 504–509.
- Palumbo S. A., Bencivengo M. M., Corral F. D., Williams A. C e Buchanan R. L. (1989). Characterization of The *Aeromonas hydrophila* Group Isolated from Retail Foods of Animal Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 5: 854:859.
- Parker J. L., Shaw J. G. (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology e disease. *Journal of Infection*, 62(2): 109–118.
- Pemberton J. M, Kidd S. P., Schmidt R. (1997). Mini-review- Secreted enzymes of *Aeromonas*. *Federation of European Microbiological Societies- Microbiology letters*, 152: 1-10.
- Pesavento G., Calónico C., Ducci B., Magnanini A., Lo Nostro A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Journal of Food Microbiology*, 41: 1–7.
- Philips C. A. (2002). Comparison of the Microflora on Organically and Conventionally Grown Spring Mix. Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da Universidade da Geórgia.
- Piotrowska M., Popowska M. (2015). Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6 (694): 1-16.
- Puthucherry S. D., Puah S. M., Chua K. H. (2012). Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Aeromonas* Species from Malaysia. *PLoS One*, 7(2): 1–7.

- Quendera A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils against multiresistant aeromonads e enterococci. Dissertação apresentada ao Mestrado de Microbiologia Aplicada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Radhouani H., Silva N., Poeta P., Torres C., Correia S. e Igrejas G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment e human health. *Frontiers in Microbiology*, 5 (23): 1–12.
- Ramos B., Miller F. A., Brandão T. R. S., Teixeira P., Silva C. L. M. (2013). Fresh fruits e vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 20: 1–15.
- Ribeiro A. R. G. (2013). Impacto da distribuição na qualidade de produtos hortofrutícolas frescos. Tese apresentada no curso de Mestrado em Engenharia Alimentar no Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- Riboldi G. P., Frazzon J., D’Azevedo P. A., Frazzon A. P. G. (2009). Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus* spp. Isolated From Food in Southern Brazil. *Journal of Microbiology*, 40: 125-128.
- Said L. B., Klibi N., Dziri R., Borgo F., Boudabous A., Slama K. B., Torres, C. (2015). Prevalence, antimicrobial resistance e genetic lineages of *Enterococcus* spp from vegetable food, soil e irrigation water in farm environments in Tunisia. *Journal of Science of Food and Agriculture*.
- Santos J., Oliveira M. B. P. P. B., Ibáñez E., Herrero M. (2014). Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography*, 1327 (31):118–131.
- Santos S. F. C. (2011). The dual role of enterococci in food technology: bacteriocin production versus pathogenicity potential. Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Microbiologia Aplicada na Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa.
- Santos V. (2012). Diversidade microbiana, suscetibilidade a antibióticos e fatores de virulência em *Enterococcus* spp. Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Microbiologia Aplicada na Faculdade de Ciências da Univrsidade de Lisboa.
- Schwaiger K., Helmke K., Hölzel C. S., Bauer J. (2011). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs . supermarket). *International Journal of Food Microbiology*, 148: 191–196.
- Semedo T., Santos M. A., Lopes M. F. S, Marques J. J. F., Crespo M. T. B., Tenreiro, R. (2003). Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A common trait in the Genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 13–22.
- Semedo-Lemsaddek T., Nóbrega C. S., Ribeiro T., Pedroso N. M., Sales-Luís T., Lemsaddek A., Tenreiro R., Tavares L., Vilela C. L., Oliveira M. (2013). Virulence traits e antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Journal of Veterinary Microbiology*, 1-5.
- Sinha S., Chakraborty R., De K., Khan A., Datta S., Ramamurthy T., Bhattacharya S. K., Takeda Y. e Nair G. B. (2002). Escalating Association of *Vibrio cholerae* O139 with Cholera Outbreaks in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (7): 2635–2637.
- Slanetz L. W. e Bartley C. H. (1957). Numbers of enterococci in water , sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology*, 74: 591-595.
- Smith-Spangler C., Brandeau M. L., Hunter G. E., Bavinger C., Pearson M., Eschbach P.J., Sundaram V., Liu H., Schirmer P., Stave C., Olkin I., Bravata P.M. (2012). Are Organic Foods Safer or Healthier Than Conventional Alternatives. *Review Annlas of Internal Medicine*.157:348-366.
- Spadaro S., Berselli A., Marangoni E., Romanello A., Colamussi M. A., Ragazzi R., Zardi S. e Volta C.A (2014). *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis e sepsis in an immunocompromised patient: a case report e review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 8: 315.

- Stratev D., Odeyemi O. A. (2015). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 1-10.
- Stratev D., Vashin I. e Rusev V. (2012). Prevalence e survival of *Aeromonas* spp . in foods – a review. *Revue Méd. Vét*, 163 (10):486–494.
- Tavares A. B., Cereser N. D., Timm C. D. (2014). Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. *Arq.Inst.Biol - São Paulo*, 20 (10): 1–8.
- Terkuran M., Erginkaya Z., Ünal E., Güran M., Kizilyildirim S., Ugur G., Köksal F. (2014). The relationship between virulence factors and vancomycin resistance among Enterococci collected from food and human samples in. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61: 133–140.
- Tomás J. M.. (2012). The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *International Scholarly Research Network Microbiology* , 1–22.
- Torre I., Pennino F., Diana M. V., De Marco G., Trotta A. M., Borriello T., Troiano E. (2010). Antimicrobial susceptibility e glycopeptide-resistance of enterococci in vegetables. *Italian Journal of Public Health*, 7 (1): 47–53.
- Tripathi N. e Choudhary A. (2014). Isolation e Identification Of Enteropathogenic *Aeromonas hydrophila* From Laharpur Water Reservoir, Bhopal. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3 (2): 556–560.
- Trivedi K., Cupakova S., Karpiskova R. (2011). Virulence factors e antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56 (7): 352–357.
- Tyne D. V., Martin M. J. e Gilmore M. S. (2013). Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Journal Toxins*, 5: 895–911.
- Upadhyaya P. M. G., Ravikumar K. L. ,Umapathy B. L. (2009). Review of virulence factors of *Enterococcus*.: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medicinal Microbiology*, 27 (4): 301-305.
- Varela A. R., Ferro G., Vredenburg J., Yanik M., Vieira L., Rizzo L., Lameiras C., Manaia C. M. (2013). Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. *Journal Science of the Total Environment*, 450-451:155-161.
- Venkataiah P., Poojary N. S. e Harshvardhan B. (2013). A multiplex PCR for detection of haemolytic *Aeromonas hydrophila* from vegetable sources in Karnataka, India. *Recent Research in Science and Technology*, 5 (3): 19–23.
- Whitman W. B., Chun J., Dedysh S., De Vos P., Hedlund B. P., Kämpfer P., Rainey F. A., Trujillo M. E., Nedashkovskaya O. I. (2015). Bergey's Manual of Systematic of Archaea and bacteria. Wiley.
- Willems R. J. L., Hanage W. P., Bessen D. E. e Feil E. J. (2012). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35 (5): 872–900.
- Yano Y., Hamano K., Tsutsui I., Aue-umneoy D., Ban M., Satomie M. (2015). Occurrence, molecular characterization, e antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Journal Food Microbiology*, 47: 21–27.